Aus dem Lehrstuhl für Klinische Biochemie
der Universität Düsseldorf und der Biochemischen Abteilung
des Diabetes-Forschungsinstitutes
Direktor: Prof. Dr. med. H. Reinauer

Wechselwirkungen zwischen Lipid- und Kohlehydratstoffwechsel im Herzmuskel der diabetischen Ratte

Habilitationsschrift

Der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der
venia legendi für das Fach Klinische Biochemie

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Peter Rösen

Düsseldorf 1983

Aus dem Lehrstuhl für Klinische Biochemie
der Universität Düsseldorf und der Biochemischen Abteilung
des Diabetes-Forschungsinstitutes
Direktor: Prof. Dr. med. H. Reinauer

Wechselwirkungen zwischen Lipid- und Kohlehydratstoffwechsel im Herzmuskel der diabetischen Ratte

Habilitationsschrift

Der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der
venia legendi für das Fach Klinische Biochemie

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Peter Rösen

Düsseldorf 1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0030

Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel im Herzmuskel der diabetischen Ratte.

	Seite
A EINLEITUNG	1
B METHODEN	10
1. Das Modell des isoliert-perfundierten Herzens	10
2. Analytische Methoden	13
3. Enzymatische Untersuchungen	16
a. Triacylglycerin-Hydrolase	16
b. Pyruvatdehydrogenase und Carnitinacyltransferasen	19
c. Adenylatcyclase, Phosphorylase, Glycogensynthase	20
4. Chemikalien	23
5. Berechnungen und Statistik	25
C ERGEBNISSE	26
1. Streptozotocin-Diabetes bei der Wistar-Ratte: Untersuchungen am nicht-perfundierten Herzen	26
Zusammenfassung	37
2. Einfluß von Streptozotocin-Diabetes auf die Funktionseigenschaften sowie den Glucosestoffwechsel und die Lipolyse des isoliert-perfundierten Rattenherzens	38
a. Mechanische Eigenschaften und Energiestatus des Herzens	38
b. Glucosemetabolismus	46
c. Lipolyse	59
d. Glucoseumsatz und Sauerstoffbilanz	61
e. Einfluß von Arbeit auf den myokardialen Glucoseumsatz	66
Zusammenfassung: Einfluß von SZ-Diabetes auf den myokardialen Glucosemetabolismus und die Lipolyse	69

3. Wechselwirkungen zwischen Lipolyse und Glucosemetabolismus im isoliert-perfundierten Herzen 72
a. Substratabhängigkeit der Lipolyse und Einfluß von Insulin 72
b. Einfluß von Catecholaminen und Glucagon 77
c. Auswirkungen der Hemmung der Carnitinacyltransferase-Aktivität auf Lipolyse und Glucosemetabolismus 79
Zusammenfassung: Wechselwirkungen zwischen Glucose- und Lipidmetabolismus 89
4. Eigenschaften und Regulation der Triacylglycerin-Hydrolase 92
5. Adenylatcyclase, Phosphorylase und Glycogensynthase-Aktivitäten im SZ-diabetischen Rattenherzen 104
Zusammenfassung: Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen 108

D DISKUSSION 111

E ZUSAMMENFASSUNG 143

F LITERATUR 148

Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
CPT	Carnitinpalmitoyltransferase
CP	Creatinphosphat
C	Creatin
CoA	Coenzym A
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DTT	Dithiothreitol
FDP	Fructose-1,6- bisphosphat
FG	Feuchtgewicht
G6P	Glucose-6-Phosphat
α-GP	α-Glycerinphosphat
IBMX	Isobutylmethylxanthin
LPL	Lipoproteinlipase
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUO	4-Methylumbelliferyloleat
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PLV	linksventrikulärer Druck
POCA	Natrium 2-[5-(4 chlorphenyl)-pentyl]-oxiran-2-carboxylat
SZ	Streptozotocin
TGL	Triacylglycerin-Hydrolase
UDPG	Uridindiphosphat-Glucose
v/v	Volumenanteile
w/v	Gewichtsanteile

A EINLEITUNG

Diabetiker weisen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine erhöhte Morbidität und Mortalität auf Grund von kardiovaskulären Erkrankungen auf (Goetz, 1967, Ostrander et al., 1965, Garcia et al., 1969). Neben atherosklerotischen Veränderungen der großen Koronargefäße im Sinne einer Makroangiopathie (Boucher et al., 1979, Crall u. Roberts, 1978) wurde vermutet, daß auch mikroangiopathische Alterationen der kleinen Gefäße zu dem erhöhten Koronarrisiko von Diabetikern beitragen (Rubler et al., 1972, Hamby et al., 1974, Shapiro, 1982).

In histologischen Untersuchungen wurde eine vermehrte Proliferation der Intima, Verdickungen der Gefäßwände (Rubler et al., 1972, Hamby et al., 1974, Pearce et al., 1973), das Auftreten von perivaskulärer und interstitieller Fibrose (Ledet, 1976) sowie die Akkumulation von Glycoproteinen und Lipiden im Interstitium der Koronararterien (Regen et al., 1977) nachgewiesen.
Verdickungen der Basalmembranen der Kapillargefäße, wie sie typischerweise in der Niere und Retina auftreten, wurden auch an den Kapillaren der Koronargefäße im Herzen von Diabetikern nachgewiesen (Fischer et al., 1979).

Da andererseits die Funktion des linken Ventrikels bei Insulinmangel-Diabetikern (Typ I-Diabetikern) häufig eingeschränkt ist (Rynkiewicz et al., 1980, Shapiro et al., 1980, 1981, Seneviratne, 1977, Sanderson et al., 1978), ohne daß vaskuläre Alterationen nachgewiesen werden konnten, wurde angenommen, daß im Typ I-Diabetes metabolische Defekte die kardiale Funktion beeinträchtigen (Opie et al., 1979, Ledet, 1968).

Tab. 1 gibt eine Übersicht über die in der Literatur diskutierten Störungen des kardialen Metabolismus.

Metabolische Veränderungen im diabetischen Herzmuskel

Kohlenhydratstoffwechsel
- Störung des Transportes von Glucose durch die Zellmembran
- Verminderung der Phosphorylierung von intrazellulärer Glucose
- Akkumulation von Glucose in der Zelle
- Akkumulation von Hexosemonophosphaten
- Hemmung der Phosphofructokinase
- Verminderte Glycogensynthase-Aktivität
- Vermehrtes myokardiales Glycogen
- Verminderte Aktivität der Pyruvatdehydrogenase
- Verminderte Glucose-Oxidation
Lipidstoffwechsel
- Erleichterte Aufnahme und Speicherung von Fettsäuren
- Vermehrte Synthese von Triglyceriden
- Verminderter Einbau von Ölsäure aus dem Blut in myokardiale Phospholipide und Triglyceride

Tab. 1: Diskutierte Veränderungen des Herzmuskelstoffwechsels im Diabetes. (modifiziert nach Opie et al., 1979)

Daß im Diabetes die Utilisation von Glucose im Herzen wie im Skelettmuskel gestört ist, belegen eine Reihe von Untersuchungen (Knowlton u. Starling, 1912, Morgan et al. 1961, Newsholme u. Randle, 1964, Randle u. Newsholme, 1964, Manford u. Opie, 1968, Morgan u. Neely, 1974, Opie et al., 1979). Im einzelnen wurde ein verminderter aktiver Transport von Glucose durch die Plasmamembran in die Herzzelle bzw. eine verringerte Insulin-Sensitivität dieses Prozesses im diabetischen Herzen durch eine Veränderung der apparenten K_m und/oder V_{max} beschrieben (Kipnis, 1959, Newsholme u. Randle, 1964, Randle et al. 1963, 1966, Morgan et al., 1959, Riddick, 1962). Zusätzlich wurde auf Grund von Durchsatzmessungen angenommen, daß die Glucose-Utilisation durch eine Inhibition der Glucosephosphorylierung auf der Stufe der Phosphofructokinase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glycolyse, und sekundär der Hexokinase über den Anstau von Glucose-6-P gehemmt wird

(Newsholme et al., 1962, Garland et al., 1963, Newsholme u. Start, 1977). Weiterhin wird die Oxidation glycolytisch gebildeten Pyruvates durch die geringe Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (PDH) limitiert (Garland u. Randle, 1964). Der vermehrte Gehalt an Glycogen im diabetischen Herzen wird einerseits als Folge der Aktivierung der Glycogensynthase durch akkumulierendes Glucose-6-P diskutiert (Rosell-Perez et al., 1962), Untersuchungen von Miller (1978) weisen andererseits daraufhin, daß die Aktivität der Glycogensynthase und sowie ihre Insulinsensitivität im diabetischen Herzen vermindert sind. Eine weitergehende Charakterisierung dieses Defektes steht aus.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist im Insulinmangel neben dem Kohlenhydratstoffwechsel auch der Lipidmetabolismus verändert (Denton u. Randle, 1967). Dies ist insbesondere von Bedeutung, da im menschlichen Herzen im Ruhezustand 40 - 60 % des kardialen Sauerstoffverbrauches auf die Oxidation von Fettsäuren und nur 30 % auf die Oxidation von Glucose entfallen (Most et al., 1969) sowie maximal bis zu 80 % des gesamten myokardialen Sauerstoffverbrauches für die Oxidation von Fettsäuren aufgewendet werden können (Lassers et al., 1972, Most et al., 1969). Experimentelle Untersuchungen zeigen ferner, daß Fettsäuren vom Herzmuskel bevorzugt aufgenommen werden (Shipp et al., 1961), daß ihre Aufnahme diffusionskontrolliert, aber energieunabhängig erfolgt und bei einer Konzentration von 0,5 - 0,6 mmol/l einen Sättigungswert erreicht. Unter diesen Bedingungen wurden bis zu 80 % der angebotenen Fettsäuren vom Herzen aufgenommen (Evans et al., 1963, Oram et al., 1973). Da das Verhältnis von freien Fettsäuren zu Albumin für die Aufnahme entscheidend ist (Evans et al., 1963), gleichzeitig aber die Konzentration an Plasmaproteinen relativ konstant ist, bedingt ein Anstieg der Fettsäurekonzentration im Plasma, wie er im Insulinmangel auftritt, eine Beschleunigung der Fettsäureaufnahme durch das Herz.
Diese Präferenz des myokardialen Stoffwechsels für Fettsäuren ist im Diabetes aus zwei Gründen von besonderer Bedeutung:

(a) Die Oxidation von Fettsäuren ist verbunden mit einem höheren Sauerstoffbedarf pro synthetisiertem ATP (Lehninger, 1979), gleichzeitig ist aber im Diabetes die Wahrscheinlichkeit einer eingeschränkten Sauerstoffversorgung des Gewebes auf Grund von makro- und mikroangiopathischen Gefäßveränderungen erhöht (Ledet, 1968). Auch eine Vergrößerung des Anteils der glykosylierten Hämoglobine und die hierdurch bedingte erhöhte Affinität des Hämoglobins zu Sauerstoff sowie Veränderungen der rheologischen Eigenschaften des Blutes (Brownlee, 1979) könnten zu einer Limitierung des Sauerstoffangebotes beitragen (Allison et al., 1976, Ditzel u. Standl, 1975). Im diabetischen Herzen würde somit einem hohen Sauerstoffbedarf auf Grund der Fettsäure-Oxidation ein limitiertes Sauerstoffangebot gegenüberstehen.

(b) Es ist bekannt, daß höhere Plasmakonzentrationen an Triglyceriden und freien Fettsäuren zu einer Verminderung der Glucose-Oxidation führen, worauf sowohl klinische als auch experimentelle Untersuchungen hinweisen (Randle et al., 1963). Am isoliert perfundierten Herzen führten Perfusionen mit Fettsäuren oder Ketonkörpern zur vollständigen Blockierung der Oxidation von Glucose (Shipp et al., 1961, Newsholme et al., 1964, Randle et al., 1964, Rösen et al., 1981).

Randle et al. (1963) schlugen zur Erklärung des funktionellen Zusammenhanges zwischen Lipid- und Glucose-Stoffwechsel den „Glucose-Fettsäure-Zyklus"vor (Abb. 1), wonach zwischen Plasmafettsäuren und Glucose-Umsatz eine reziproke Beziehung besteht. Lipolyse im Fettgewebe mit einem vermehrten Anfluten von Plasmafettsäuren führt zur Reduktion der Glucose-Utilisation durch die Muskulatur; eine Folge der antilipolytischen Wirkung von Insulin auf das Fettgewebe ist auf Grund des veränderten Substratangebotes die Stimulation des Glucose-Umsatzes im Herzen und der Muskulatur (Newsholme et Randle, 1964). Der Phosphofructokinase und der PDH werden dabei besondere regulatorische Funktionen zugeordnet, da ihre Aktivität über Acetyl-CoA

bzw. das Folgeprodukt Citrat reguliert wird (Mansour, 1972, Parmeggiani u. Bowmann, 1971, Newsholme u. Randle, 1962, Garland et al., 1962, Randle et al., 1966, Passonneau u. Lowry, 1971).

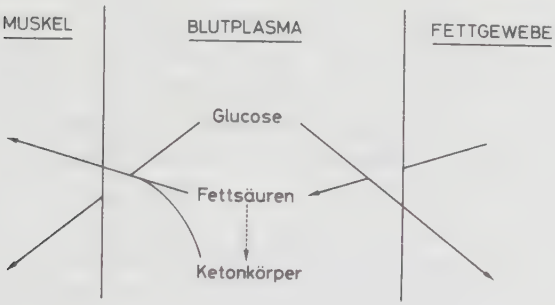


Abb. 1: „Glucose-Fettsäure-Zyklus" nach Randle et al. (1963) zwischen Lipolyse im Fettgewebe und Glucose-Umsatz in Muskulatur und Herz.

Die unter diabetischen Stoffwechselbedingungen beobachtete Störung des Glucose-Stoffwechsels würde dieser Hypothese entsprechend im wesentlichen auf das gesteigerte Substratangebot an freien Fettsäuren, Triglyceriden und gegebenenfalls Ketonkörpern zurückzuführen sein und somit einen Postrezeptordefekt im Sinne einer Adaptation des myokardialen Stoffwechsels an das im Insulin-Mangel veränderte Substratangebot, nicht aber im Sinne einer Störung des Insulinsignal-Transfers darstellen.

Die Beantwortung der Frage, inwieweit die beschriebenen Veränderungen des myokardialen Kohlenhydratstoffwechsels Ausdruck des im Insulinmangel beschleunigten Lipidumsatzes ist, ist somit eine Voraussetzung für das pathobiochemische Verständnis der „Insulinresistenz" des myokardialen Stoffwechsels im Sinne einer verminderten oder fehlenden

biologischen Antwort auf Insulin und ermöglicht erst zu entscheiden, auf welcher zellulären Ebene die Ursachen der Insulinresistenz zu suchen sind.

Auch ist zu vermuten, daß die widersprüchlichen Ergebnisse von Untersuchungen zur Frage, ob der Glucosestoffwechsel im diabetischen Herzen durch Insulin in vitro beeinflußt werden kann, durch die unterschiedlichen Modelle des experimentellen Diabetes und ihres differenten Einflusses auf den Lipidstoffwechsel zu erklären sind. So benützten die Arbeitsgruppe um Randle und Morgan Herzen alloxandiabetischer Ratten (Morgan et al., 1961, Newsholme u. Randle, 1962, Morgan et al., 1963, Newsholme et al., 1964, Neely u. Morgan, 1974), bei denen in der Phase der Ketose nach Applikation von Alloxan Triglyceride im Herzen akkumulieren (Denton u. Randle, 1967, Rizza et al., 1971), während im kurzfristig hervorgerufenem Insulin-Mangel eine derartige massive Beeinflussung des Lipidstoffwechsels nicht beobachtet wurde (Chain et al., 1969).

Nicht zu unterschätzen sind auch methodische Probleme bei der Perfusion isolierter Organe. So wurde die überwiegende Zahl der metabolischen Untersuchungen am isoliert-perfundierten Herzen mit einem rezirkulierenden Perfusionssystem durchgeführt. Die Akkumulation von Lactat und Pyruvat im Perfusionsmedium ist insbesondere bei den vielfach verwendeten kleinen Perfusionsvolumina nicht zu vermeiden, so daß Interferenzen beider Metabolite mit dem Glucosestoffwechsel nicht auszuschließen sind (Mowbray u. Ottaway, 1973).

Da die Inhibition des Glucose-Umsatzes nicht nur durch exogene Fettsäuren, sondern auch durch lipolytisch aus endogenen Triglyceriden freigesetzten Fettsäuren möglich ist, ist es denkbar, daß auch unter Bedingungen, unter denen Glucose das einzige exogene Substrat darstellt, endogen mobilisierte Fettsäuren und deren Oxidation zur Fortdauer der Insulinresistenz im Sinne einer verminderten Sensitivität und biologischen Antwort auf physiologische Insulinkonzentrationen (Kahn, 1978) des diabetischen Herzens beiträgt. Die

Regulation der Lipolyse endogener Triglyceride stünde somit in engem Zusammenhang mit der Frage der Reversibilität des inhibierten Glucoseumsatzes unter diabetischen Stoffwechselbedingungen.

Während über regulatorische Einflüsse erhöhter Plasmafettsäuren auf den Kohlenhydratstoffwechsel als auch auf die Lipoproteinlipase-Aktivität detaillierte Untersuchungen vorliegen (Neely u. Morgan, 1974), ist die Regulation der Lipolyse myokardialer Triglyceride sowie der an der Hydrolyse endogener Triglyceride beteiligten Triacylglycerin-Hydrolasen (TG-Lipasen) bisher weitgehend unverstanden. Die experimentellen Befunde sind widersprüchlich (Biale et al., 1968, Björntorp u. Furman, 1962, Christian et al., 1969, Mersel et al., 1979, Severson, 1979, Hülsmann u. Stam, 1978, Jesmok et al., 1976, Shousboe et al., 1973, Rösen et al., 1980, 1981). Es ist weder bekannt, wodurch die massive Lipolyse im diabetischen Herzen bei Perfusion mit Glucose zustande kommt, welche regulatorischen Funktionen die Lipolyse steuern, noch konnten die beteiligten Lipaseaktivitäten bisher näher charakterisiert werden. TG-Lipasen wurden zwar in mikrosomalen, lysosomalen und mitochondriellen Fraktionen des Herzmuskels in Abhängigkeit von der Methodik der Gewebefraktionierung und der Methodik zur Messung der TG-Lipase (Biale et al., 1968, Björntorp et al., 1962, Christian et al, 1969, Mersel et al., 1979, Severson, 1979, Hülsmann u. Stam, 1978, Jesmok et al., 1976, Shousboe et al., 1973, Wang et al., 1977) nachgewiesen. Die intrazelluläre Lokalisation bedarf jedoch noch weitere Klärung ebenso wie die Abgrenzung der TG-Lipasen von noch in den benützten Präparationen vorhandenen Lipoproteinlipase-Aktivitäten.

Ausgehend von diesen Literaturbefunden war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wechselwirkungen zwischen Glucose- und Lipidstoffwechsel sowie die Rolle der Lipolyse endogener Triglyceride und ihres Einflusses auf den myokardialen Glucoseumsatz und seine Insulinsensitivität zu charakterisieren.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung bietet sich das isoliert-perfundierte Rattenherz als Modell an. Substratangebot und Metabolitenflux sind leicht zu kontrollieren. Um Wechselwirkungen mit in das Perfusionsmedium abgegebenen Metaboliten zu vermeiden (Lactat, Pyruvat, Fettsäuren), wurde ein offenes Perfusionssystem verwendet, das zusätzlich die Möglichkeit aufweist, die Kinetik metabolischer Prozesse zu untersuchen. Der experimentelle Diabetes wurde durch einmalige Applikation von Streptozotocin (SZ, 100 mg/kg) induziert (Rudas, 1972), das bei Ratten Degranulation der ß-Zellen auf Grund seiner ß-toxischen Wirkung bewirkt und damit zur permanenten Hyperglykämie und Glucosurie führt (Rudas, 1972). Da die unterschiedlichsten Modelle des experimentellen Diabetes gebräuchlich sind (Usadel et al., 1975), die experimentellen Befunde aber auf Grund der unterschiedlichen Beeinflussung der Blutzucker-Homöostase und der sekundären Folgen des Insulinmangels schwer vergleichbar sind, mußte zunächst versucht werden, den experimentellen Diabetes zu standardisieren und seine metabolischen Auswirkungen auf das Herz (nicht-perfundiert) zu charakterisieren, um die Vergleichbarkeit der experimentellen Ergebnisse zu sichern.

Somit ergeben sich im einzelnen folgende zu untersuchende Fragenkomplexe:

(1) Welchen Einfluß hat der Insulinmangel auf den Stoffwechsel des nicht-perfundierten Rattenherzens (Energiestatus, stationäre Konzentrationen wichtiger Metabolite der Glycolyse, Pyruvatdehydrogenase-Aktivität, myokardiale Lipide)?

(2) Inwiefern unterscheiden sich isoliert-perfundierte Herzen diabetischer und nicht-diabetischer Ratten in ihrer Funktion, ihrem Energiestatus und dem Substratstoffwechsel? Welchen Einfluß hat Insulin im isoliert-perfundierten Herzen diabetischer Ratten auf den Glucose- und Energiestoffwechsel?

(3) Welche Rolle spielt die Lipolyse endogener Triglyceride für die Energiebereitstellung sowie die Insulinsensititvität von Glyco-

lyse und Glucoseoxidation im diabetischen Rattenherzen?

(4) In welchem Maße tragen insbesondere Postinsulinrezeptor-Defekte zur Insulinresistenz des glycolytischen und oxidativen Glucoseumsatzes sowie des Glycogenstoffwechsels bei?

(5) Welche Faktoren regulieren die myokardiale Lipolyse und die involvierte Triacylglycerin-Hydrolase?

Da es sich zur Beantwortung der gestellten Fragen als notwendig erwies, neben metabolischen Untersuchungen am intakten, isoliert-perfundierten Herzen auch enzymatische Untersuchungen durchzuführen, werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nach Darstellung der benützten Methoden zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen am isoliert-perfundierten Herzen und dann die Ergebnisse der enzymatischen Studien gesondert besprochen.

Aus diesen Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Lipid- und Glucosestoffwechsel des diabetischen Rattenherzens wird eine Charakterisierung der Auswirkungen des Insulinmangels auf den myokardialen Metabolismus sowie der Postinsulinrezeptor-Defekte, die für die im diabetischen Herzen verminderte Insulinsensitivität verantwortlich sind, erwartet. Eine Normalisierung des Glucosestoffwechsels und seiner Insulinsensitivität durch gezielte Beeinflussung eines Postinsulinrezeptor-Defektes könnte einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen.

B METHODEN

1. Das Modell des isoliert-perfundierten Herzens

Tiere:

Männliche Wistar-Ratten (Stamm: Bor WISW SPF TNO) der Firma Winkelmann mit einem Körpergewicht von 250 - 300 g wurden unter Laboratoriumsbedingungen gehalten, erhielten eine Standarddiät (Sniff, Soest) und Wasser ad libitum. 20 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren zur Standardisierung der Untersuchungsbedingungen das Futter entzogen.

Streptozotocin-Diabetes:

Streptozotocin wurde unmittelbar vor Gebrauch in Citrat Puffer (0,1 mol/l, pH 4,5) gelöst und intraperitoneal appliziert.
Folgende Dosierungen wurden verwendet:
100 mg SZ/kg Körpergewicht für die Induzierung einer akuten Diabetesform mit Ketoazidose. 3 Tage nach Applikation wurden die Versuche durchgeführt („SZ-Diabetes").
60 mg SZ/kg Körpergewicht für die Induktion einer milderen Verlaufsform des Diabetes mellitus. 30 Tage nach Applikation erfolgte die Durchführung der Versuche („chronischer Diabetes").

Klinisch-chemische Bestimmungen zur Charakterisierung des Streptozotocin-(SZ)Diabetes:
Blutglucose wurde mit Hilfe der Glucoseoxidase Methode (Glucose-Analyzer, Beckman Instr., München) erfaßt, der Urin auf Glucosurie und Ketonurie mit Hilfe von „Gluketur"-Sticks (Boehringer, Mannheim) geprüft. Im Plasma wurden bestimmt: Acetoacetat, ß-Hydroxybutyrat und Triglyceride (Bergmeyer, 1974). Insulin wurde mit Hilfe einer radioimmunologischen Methode (Polyäthylenglykol, Serono Lab., Braintree, Mass., USA) bestimmt.

Die Befunde zur Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellage der Versuchtstiere sind unter C 1. dargestellt.

Präparation der Herzen:

Ratten wurden nach kurzer Äthernarkose (1 - 2 min.) mit Urethan (1,5 g/kg Körpergewicht) anästhesiert und erhielten 250 I.U. Heparin i.v.. Nach Tracheotomie wurden die Tiere künstlich beatmet (Braun-Melsungen). Die Aorta wurde nach Thorakotomie in situ kanüliert und das Herz gemäß Langendorff (1895) vor Exzision in einem offenen Perfusionssystem bei konstantem Perfusionsdruck (60 mmgHg = 8000 Pa) perfundiert. Nach Ligatur der Venae cavae (superior, azygos u. inferior) wurden die Herzen mitsamt den Lungenflügeln exzisiert, die A. Pulmonalis kanüliert. Die Herzen wurden nach Massenligatur - um die lungenseitigen Gefäße zu unterbinden - und Entfernung des überflüssigen Lungengewebes in die temperierte Perfusionskammer (37° C) transferiert (Abb. 2).

Langendorff-Modell:

Die spontan schlagenden Herzen wurden bei konstantem Druck (60 mm Hg) mit Krebs-Henseleit-Puffer mit 5 % CO_2 in Sauerstoff (pH 7,4, 37° C) perfundiert, in dem je nach Versuchsziel Substrate der angegebenen Konzentrationen gelöst waren. Nach einer Äquilibrationsphase von 15 min. wurden Frequenz, linksventrikulärer Druck, dp/dt sowie der enddiastolische Druck mit Hilfe von Statham Druckwandlern (Sp 23AA und Sp23DB) und einem 8-Kanal-Registrierungssystem (Dynograph, Beckman Instruments, München) gemessen. Der koronare Fluß wurde mit graduierten Meßzylindern, der venöse und arterielle Sauerstoffpartialdruck mit Hilfe von Sauerstoffelektroden Clark (Clark et al., 1953, Eschweiler, Kiel) bestimmt.

Arbeitendes Herz:

Nach einer Äquilibrierungszeit von 15 min. wurden die Herzen mit einem Inflow von von 15 ml/min. in den linken Vorhof perfundiert.

Der aortale Ausflußdruck lag unter diesen Bedingungen bei 40 mm Hg (5,3 kPa) und resultierte in einem koronaren Fluß von 8 - 10 ml/min (low work). High work Bedingungen wurden durch eine Erhöhung des arteriellen Inflows in den linken Ventrikel auf 25 ml/min erreicht bei einem aortalen Ausflußwiderstand von 65 mm Hg (8,6 kPa). Wie im Langendorff Modell wurden der linksventrikuläre Druck, die Frequenz, der enddiastolische Druck, der Druck im linken Atrium und der Inflow aufgezeichnet. Am Ende der Perfusionszeit wurden die Herzen mit Hilfe einer Wollenberger Zange (Wollenberger et al., 1969) in flüssigem Stickstoff gefriergestoppt und in flüssigem Stickstoff bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

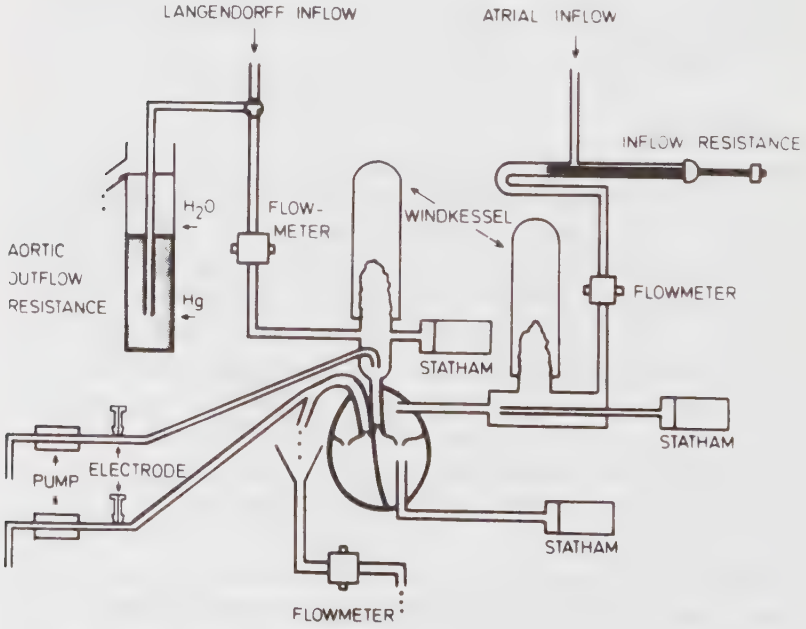


Abb. 2: System zur Perfusion isolierter Herzen (modifiziert nach Müller-Ruchholtz und Reinauer, 1976)

Messung von radioaktivem CO_2:

Die Utilisation von radioaktiven Substraten wurde über die Bildung von $^{14}CO_2$ verfolgt. Das gebildete CO_2 wurde im venösen Perfusionsmedium bestimmt. Ein aliquoter Teil des die A. pulmonalis durchströmenden Perfusates wurde mit Hilfe einer Pumpe (Multiperpex 2115, LKB) in Widmark-Gefäßen aufgefangen, mit 1 N HCl angesäuert und das entweichende CO_2 in Phenylaethylamin absorbiert. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationslösung (Quickszint, Zinsser, Frankfurt) wurde die Radioaktivität der Phenylaethylamin-Phase im Flüssigszintillationszähler (MR 300, Kontron, Münchenstein, Schweiz) mit automatischer Quenchkorrektur bestimmt. Ein Verlust von radioaktivem CO_2 während der Perfusion und der nachfolgenden Schritte konnte durch Kontrollversuche mit radioaktivem $NaHCO_3$ ausgeschlossen werden.

Perfusionsmedium:

Krebs-Henseleit Bicarbonat Puffer der folgenden Zusammensetzung wurde eingesetzt: 118 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l $CaCl_2$, 1,2 mmol/l KH_2PO_4, 25 mmol/l $NaHCO_3$, 1,2 mmol/l $MgSO_4$. In diesem Puffer wurden die zu untersuchenden Substrate in entsprechender Konzentration gelöst. Der Puffer wurde durch Zelluloseacetat-Filter (Millipore, Mass., Porengröße 5 µm) filtriert, mit 5 % CO_2 in Sauerstoff gesättigt und auf 37°C temperiert. Der arterielle pO_2 lag bei 600 mm Hg. Die Messung des Sauerstoffpartialdruckes erfolgte mit Clark-Elektroden (Eschweiler, Kiel). Zur Eichung der Elektroden dienten Eichgase mit definiertem Sauerstoff/Stickstoff-Gehalt. Die Steigung der Regressionsgeraden (Sauerstoffpartialdruck vs. elektrischer Spannung am Meßgerät) wurde zur Berechnung des jeweiligen Sauerstoffpartialdruckes unter Berücksichtigung des Atmosphärendruckes herangezogen.

2. Analytische Methoden

Das gefriergestoppte Herzgewebe wurde mit einem Zahnbohrer von den

Vorhöfen, Lungen- und Fettgewebe sowie anhaftendem Perfusionsmedium befreit. Zur Bestimmung der myokardialen Metabolite wurde das Gewebe in einem vorgekühlten Mörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Ein aliquoter Teil wurde in eine vorgewogene Menge Perchlorsäure (0,6 mol/l) eingewogen und homogenisiert (Ultraturrax, Jahnke, Staufen, 2x30 sec.). Nach Zentrifugation (10 min., 10 000 U/min., Sorvall RC2B) wurden in dem neutralisierten (50 % KOH) und erneut zentrifugierten (10 000 U/min., 10 min., Sorvall RC"B, 4°C) Perchlorsäureextrakt die folgenden Metabolite mit Hilfe enzymatischer Methoden (Bergmeyer, 1974) bestimmt:
ATP, ADP, AMP, Creatinphosphat (CP), Creatin (C), Glucose-6-Phosphat (G6P), Fructose-1,6-bisphosphat (FDP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), α-Glycerinphosphat (α-GP), Lactat, Pyruvat, Citrat, Glycerin.

In einem weiteren aliquoten Teil des tiefgefrorenen Herzgewebes wurden Glycogen nach Bergmeyer (1974) nach alkalischer Hydrolyse sowie das myokardiale Trockengewicht (20 Stunden, 110°C) bestimmt.

Im Perfusionsmedium wurde neben radioaktivem CO_2 Pyruvat, Lactat und Glycerin (nach Lyophilisation) mit Hilfe der genannten enzymatischen Methoden bestimmt.

Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von Pyruvat:

Um die Verdünnung der radioaktiven exogenen Glucose durch Glycogenglucose zu erfassen, wurde die spezifische Radioaktivität von Pyruvat im kardialen Effluat experimentell bestimmt und mit der spezifischen Aktivität der eingesetzten ^{14}C-D-Glucose verglichen. Lyophilisiertes Perfusionsmedium (0,5 ml) wurde chromatographiert (Dowex 1x10 Cl^-, 200 - 400 mesh, Biorad, Mass., neutral gewaschen). Die Säule wurde mit Wasser und verdünnter Salzsäure (0,01 mol/l, jeweils 50 ml) zur Entfernung von CO_2, Lactat und anderen radioaktiven Komponenten gewaschen.
Pyruvat wurde mit 0,04 mol/l HCl eluiert. Unter derartigen Elutionsbedingungen wurde Pyruvat mit einer Ausbeute von 79 % erfaßt.

CO_2, Lactat, Acetat, Dicarbonsäuren sowie Glutamin und Asparaginsäure konnten in dem Pyruvat enthaltenden Säuleneluat nicht nachgewiesen werden. In den eluierten Pyruvat-Fraktionen wurde nach Neutralisation und Lyophilisation die Radioaktivität direkt, Pyruvat enzymatisch bestimmt.

Triglyceridbestimmung:

Pulverisiertes Herzgewebe wurde in Chloroform/Methanol (2:1 v/v, Folch et al., 1957) homogenisiert (Glas-Teflon-Homogenisator) und über Nacht extrahiert. Nach Zentrifugation und Waschen des Sedimentes mit $CHCl_3/CH_3OH$ wurde der Chloroform-Methanol-Extrakt zur Abtrennung der Fettsäuren mit einem Drittel Volumen 4 mmol/l $MgCl_2$ versetzt und geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase verworfen; die Triglyceride enthaltende untere Phase wurde unter Stickstoff eingeengt und mit äthanolischer KOH (1 ml 10 mol/l KOH + 9 ml abs. Äthanol) hydrolysiert (55°C, 45 min.). Nach Neutralisation mit 10 mol/l $HClO_4$ und Versetzen mit $MgCl_2$ (0,5 mol/l) wurde das Präzipitat abzentrifugiert und das aus Triglyceriden gebildete Glycerin enzymatisch bestimmt (Bergmeyer, 1974).

Dünnschichtchromatographie:

Für die Analytik der myokardialen Lipide wurde Frierstopp-Pulver nach Zugabe von Heptadecansäure, Triheptadecanoat sowie L-Phosphatidylcholin-^{14}C-dipalmitat als interne Standards mit Chloroform/Methanol (Folch et al., 1957) extrahiert. Die getrockneten Lipide wurden in $CHCl_3/CH_3OH$ (2:1 v/v) gelöst und auf Silicagel (Kieselgel 60, Merck) mit Hexan-Diäthyläther/Essigsäure (80/20/1 v/v/v) als Elutionssystem chromatographiert. Das die Lipide enthaltende Kieselgel wurde über cochromatographierte Referenzsubstanzen (Schwefelsäure 50 % w/w) identifiziert, von der Platte entnommen und mit Chloroform/Methanol-Gemischen (Phospholipide 1:3 v/v, freie Fettsäuren 2:1 v/v, Triglyceride 1:10) eluiert.

Nach Trocknung unter Stickstoff und Zusatz von Heptadecansäure zur

isolierten Phospholipidfraktion erfolgte die Methylierung der Fettsäuren mit Hilfe von BF_3/Methanol nach Morrison u. Smith (1964): freie Fettsäuren 3 ml 20 % BF_3/Methanol, Phospholipide 3 ml 14 % BF_3/Methanol, Triglyceride 1 ml 14 % BF_3/Methanol, 0,8 ml n-Hexan und 2,2 ml Methanol. Die Röhrchen wurden gasdicht verschlossen (Teflonkappe) und auf 110°C erhitzt. Die Reaktionszeit betrug für freie Fettsäuren 5 min., für Phospholipide 20 min. und für Triglyceride 30 min.. Nach Abkühlen wurden die Lösungen auf 1 ml eingeengt, mit Wasser versetzt und die Fettsäureester in 10 ml n-Hexan extrahiert. Die methylierten Fettsäuren wurden unter Stickstoff getrocknet und unmittelbar vor der gaschromatographischen Bestimmung (Siemens L350, Kapillarsäule 50 m WS11, WGA, Griesheim-Hiss) in n-Heptan gelöst. Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe von bekannten Standards, die Flächen wurden integriert (Spektraphysics, Darmstadt) und unter Berücksichtigung der Flächenwerte des internen Standards zur Berechnung der absoluten Menge an Fettsäuren benützt. Ausbeuteverluste während der Isolierung wurden bei den freien Fettsäuren und Triglyceriden durch die internen Standards, bei den Phospholipiden durch die Wiederfindungsrate des radioaktiven L-α-Phosphatidylcholin-^{14}C-dipalmitoyl (Aufarbeitung, Chromatographie, Veresterung) und Heptadecansäure (Gaschromatographie) korrigiert.

Proteinbestimmung:

Der Proteingehalt wurde mit Folin-Ciocalteau Reagenz nach Lowry (Lowry et al., 1950) bestimmt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (Serva, Fraktion V).

3. Enzymatische Untersuchungen

(a) Präparation und Bestimmung der Triacylglycerin-Hydrolase-(TGL)-Aktivität (EC 3.1.1.3):

Die TGL-Lipase wurde modifiziert nach Schotz et al. (1970) bestimmt.

^{14}C-Triolein und Triolein wurden in Toluol gelöst, gemischt und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Nach Zugabe eines entsprechenden Volumens an Puffer (0,1 mol/l Natriumacetat für den pH-Bereich 4 - 6,5; 0,1 mol/l TRIS-HCl für pH 7 - 8 und 0,1 mol/l Glycin für pH 8 - 9), Triton X100 und Serumalbumin wurde der Substratansatz mit einem Ultraturrax (2x30 sec) unter Eiskühlung emulgiert und bei Bedarf der pH-Wert korrigiert. 1 ml der Substratemulsion wurde 5 min. bei 37°C vor dem Start der Reaktion durch Zugabe des Enzyms (0,2 - 1 mg Protein) vorinkubiert.

Die Endkonzentrationen im Enzymansatz (1 ml) betrugen:

Albumin 15,1 mg

Triton X100 0,045 % (w/v)

^{14}C-Triolein 3,3 - 4,1 nmol entsprechend einer Aktivität 400.000 - 500.000 d/min und einer spezifischen Aktivität von 200.000 d/min x µmol

Triolein 1,7 mmol/l (bzw. gewünschter Konzentration).

Der Inkubationsansatz wurde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 5,5 ml Extraktionsgemisch (282 ml Methanol/250 ml Chloroform/200 ml n-Heptan/0,1 mmol/l Ölsäure) gestoppt. Nach Zusatz von 140 µl 2 mol/l NaOH und 60-minütigem Schütteln wurde zentrifugiert (3000 Upm, 10 min.) und 2 ml der wäßrigen Phase (Gesamtvolumen 3,3 ml) zur Zählung der Radioaktivität (entsprechend freien Fettsäuren) entnommen. Zu jedem Hauptwert (3-fach) wurde ein Leerwert (3-fach) mitgeführt, in den das Protein erst nach Zusatz des Extraktionsgemisches gegeben wurde.
Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen war die TGL linear proportional zur Zeit (90 min.) und Proteinmenge (bis 3 mg).

Fluorimetrisch wurde die Lipaseaktivität modifiziert nach Cortner et al., (1976) über die Spaltung von 4-Methylumbelliferyloleat (4-MUO) zu 4-Methylumbelliferon (4-MU) bestimmt.
2,25 ml 10 mmol/l 4-MUO wurden unter einem Stickstoffstrom getrock-

net. Der Rückstand wurde in 14,25 ml Wasser, 0,75 ml 1 % (w/v) Triton X100 und 0,7 ml Chloroform/Methanol (2:1 v/v) aufgenommen und im Eisbad emulgiert (2x60 sec, Ultraschall). Bei 30°C wurden die organischen Lösungsmittel abgedampft und die erhaltene Emulsion filtriert (Millex HA, 0,45 µm Porendurchmesser, Millipore).

Die Endkonzentrationen in 2,0 ml Volumen betrugen:

Puffer 90 mmol/l
4-MUO 150 µmol/l
Triton X100 72 µmol/l (0,0045 % w/v).

Der Enzymtest verlief linear zur Zeit (bis 10 min.) und zur Proteinmenge (10 - 190 µg).
In Tab. 2 sind beide Verfahren der Übersicht halber gegenübergestellt. Die fluorimetrische Methode hat den Vorteil, eine kinetische Methode darzustellen und in ihrer Empfindlichkeit der radioaktiven Methode überlegen zu sein. Die Spezifität ist aber auf Grund des Substrates geringer.

	Methode	
	radioaktiv	fluorimetrisch
Substrat	Triolein 1,7 mmol/l	4-MUO 150 µmol/l
Triton X100	0,7 µmol/l	0,08 µmol/l
Albumin	15,3 mg/ml	---
Emulgierung	Ultraturrax 60 sec	Ultraschall 120 sec
Emulsion	homogen verteilte Vesikel	homogen, sehr fein verteilte Vesikel
Protein	1,0 - 0,1 mg	50 µg
$\frac{\text{µmol Substrat}}{\text{µg Protein}}$	1,7 - 17	3
Inkubationszeit	60 min. (Endpunktbestimmung)	2 - 10 min. (kinetische Messung)
Nachweisgrenze	4 nmol Fettsäuren/min	2 pmol 4-MUO/min

Tab. 2: Vergleich der Triacylglycerin-Hydrolase-Bestimmungen mit ^{14}C-Triolein (radioaktive Methode) und 4-Methylumbelliferyloleat (fluorimetrische Methode)

(b) Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase (PDH)-Aktivität (EC 1.2.4.1) und der Carnitinacyltransferasen:

Die PDH wurde in gefriergestoppten Herzen nach Reinauer et al. (1968), das Verhältnis PDH_a zur PDH-Gesamtaktivität nach Wieland et al. (1971) bestimmt.
Die Endkonzentrationen im Test (1 ml) betrugen:

TRIS-HCl 0,02 mol/l, pH 7,4
Glutathion 5 mmol/l
NAD 1,51 mmol/l
Nicotinsäureamid 30 mmol/l
CoA 0,325 mmol/l
Oxalacetat 5 mmol/l
Thiaminpyrophosphat 0,05 mmol/l
$MgCl_2$ 1 mmol/l
1-^{14}C-Pyruvat 10 mmol/l, entsprechend 250 µCi/10 µmol
Albumin 0,2 % (w/v)
Lactatdehydrogenase 7 U
Citratsynthase 1 U.

Bestimmung der Carnitinpalmitoyltransferasen (EC 2.3.1.21)

Carnitinpalmitoyltransferase I (CPT I) und Carnitinpalmitoyltransferase II (CPT II) wurden durch folgende Reaktionen nach Scholte et al. (1979) bestimmt:

CPT I

Palmitoyl-CoA + ^{3}H-Carnitin ⟶ Palmitoyl-^{3}H-Carnitin + CoASH

CPT II

Palmitoyl-Carnitin + ^{3}H-Carnitin ⟶ Palmitoyl-^{3}H-Carnitin + Carnitin

Der Anteil von CPT II an dieser Austauschreaktion beträgt nach Norum (1964) und Scholte et al. (1979a, b) 84 %.
Die Extraktion des Herzgewebes erfolgte für die CPT-Messungen mit

Tricin 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, Saccharose 0,25 mmol/l.
Die Endkonzentrationen im Testansatz betrugen für CPT I:

TRIS-HCl 133 mmol/l	PEP 5 mmol/l
CoA 10 µmol/l	Albumin 36 µmol/l
ATP 2 mmol/l	Kalium-palmitat 0,25 mmol/l
$MgCl_2$ 2,5 mmol/l	Pyruvatkinase 2,5 µg
EDTA 0,5 mmol/l	Hexokinase 1 µg
KCN 1 mmol/l	^{3}H-Carnitin (0,2 Ci/mol) 0,25 mmol/l.
DTT 0,5 mmol/l	

Die Endkonzentrationen im Testansatz für CPT II waren:

TRIS-HCl 100 mmol/l, pH 7,4
Palmitoyl-Carnitin 0,5 mmol/l
CoA 1,2 mmol/l
KCN 1 mmol/l
DTT 0,5 mmol/l
^{3}H-Carnitin (0,2 Ci/mol) 2,5 mmol/l.

Die Inkubationen wurden durch Zugabe von HCl (1 ml, 1 N) gestoppt, das gebildete Palmitoylcarnitin mit n-Butanol (1 ml) extrahiert. Nach Waschen der Butanolphase mit 2 ml Wasser gesättigtem Butanol und Zentrifugation (3000 Upm, 10 min.) wurde 1 ml der Butanolphase für die Bestimmung der Radioaktivität eingesetzt.
Zu jedem Hauptwert (3-fach) wurde ein Leerwert (3-fach) mitgeführt, dem das Protein erst nach der Ansäuerung mit HCl zugesetzt wurde. Beide Reaktionen verliefen linear proportional zur eingesetzten Proteinmenge und zur Reaktionszeit.

(c) Glycogen-Phosphorylase-Aktivitäten (EC 2.4.1.1.)

Gefriergestoppte Herzen wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert und im motorgetriebenen Glas-Teflon-Homogenisator nach Zugabe von 10 Vol. (50 mmol/l NaF, 10 mmol/l EDTA) in H_2O bei 4°C homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 12.000xg 10 min. zentrifugiert (Mikrofuge B,

Beckman). Der Überstand wurde nach Entfernung von endogenem AMP durch Adsorption an Dowex AG 50 WX-4 (200 - 400 mesh) für die enzymatische Messung eingesetzt.
Die Phosphorylase-Bestimmung erfolgte im gekoppelten enzymatischen Test (Bergmeyer, 1974):

$$P_i + (Glucose)_n \longrightarrow (Glucose)_{n-1} + Glucose\text{-}1\text{-}P$$

$$Glucose\text{-}1\text{-}P \longrightarrow Glucose\text{-}6\text{-}P$$

$$Glucose\text{-}6\text{-}P + NADP \longrightarrow Gluconat\text{-}6\text{-}P + NADH + H^+$$

Im Testansatz (Volumen 0,96 ml):

Kaliumphosphat 50 mmol/l
EDTA 0,1 mmol/l
$MgCl_2$ 15 mmol/l
$NADP^+$ 0,85 mmol/l
Glucose-1,6-bisphosphat 6 µmol/l
Glycogen 2,4 mg/ml
Phosphoglucomutase 5 U/ml
Glucose-6-P-Dehydrogenase 5 U/ml.

Die Phosphorylase-Gesamtaktivität wurde nach Zugabe von AMP (1 mmol/l) bestimmt.

Zur Kontrolle wurde an einigen Präparationen die Glycogenphosphorylase-Aktivität mit ^{14}C-Glucose-1-P nach Gilboe et al. (1972) in Richtung Glycogensynthese bestimmt. Beide Messungen lieferten übereinstimmende Ergebnisse bezüglich des Verhältnisses $Phosphorylase_a$/ $Phosphorylase_{a+b}$.
Aus Kontrollmessungen an nicht-gefriergestoppten Herzen folgte ferner, daß der Frierstopp keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität bzw. den Interkonvertierungszustand der Phosphorylase hat.

Glycogensynthase-Aktivität (EC 2.4.1.11)

Die Glycogensynthase-Aktivität wurde durch den Einbau von ^{14}C-Glucose aus UDP-^{14}C-Glucose in Glycogen bestimmt (Thomas et al., 1968), wobei

die aktive Form des Enzyms (I) nicht phosphoryliert und Glucose-6-P unabhängig ist, während die phosphorylierte D-Form nur in Gegenwart von Glucose-6-P Aktivität aufweist, so daß sich das Verhältnis I/D durch Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten ± Glucose-6-P ergibt.

Endkonzentrationen im Test:

TRIS-HCl 50 mmol/l, pH 7,8
EDTA 5 mmol/l
NaF 100 mmol/l
Saccharose 82,5 mmol/l
Glycogen 6,6 mg/ml
UDP-Glucose 6,6 nmol/l (ca. 80.000 dpm/µmol).

Das Endvolumen betrug 150 µl. Die Gesamtaktivität der Glycogensynthase wurde in getrennten Ansätzen durch Zugabe von Glucose-6-P 6,6 mmol/l erfaßt (Glycogensynthase I + D).

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml 66 % Äthanol gestoppt, das gefällte Glycogen auf Glasmikrofiber-Filter (Whatman GF/C 2,5 cm) adsorbiert. Nach 4maligem Waschen mit je 5 ml 66 % Äthanol wurden die Filter getrocknet (80°C, 10 min.). Die in Glycogen eingebaute ^{14}C-Aktivität wurde unter Berücksichtigung der Quenchkorrektur nach Zugabe von 10 ml Quickszint 212 bestimmt. Als Leerwert wurde UDP-Glucose in den abgestoppten enzymatischen Ansatz gegeben. Die Leerwerte wurden weiter wie die Hauptwerte behandelt.

Adenylcyclase (EC 4.6.1.1.)

Adenylcyclase wurde nach Drummond und Duncan (1970) durch die Bildung von ^{14}C-c-AMP aus ^{14}C-ATP bestimmt.
Die Trennung der Adeninnucleotide erfolgte durch Anionenaustauscherchromatographie an Dowex AG 50 WX-4 (200 - 400 mesh) und Adsorptionschromatographie an Aluminia WN-3 (neutral) nach Salomon et al. (1974). Die Ausbeute an c-AMP wurde über die Wiederfindungsrate von 8-^{3}H-

c-AMP, das den Ansätzen nach Beendigung der enzymatischen Reaktion zugesetzt wurde, berechnet.
Im Testansatz waren enthalten (50 µl Volumen):

ATP 0,4 mmol/l
TRIS-HCl 40 mmol/l, pH 7,5
c-AMP 2 mmol/l
KCl 5 mmol/l
$MgSO_4$ 15 mmol/l
PEP 20 mmol/l
Theophyllin 8 mmol/l
NaF 8 mmol/l
Pyruvatkinase 12 U/ml.

Leerwerte enthielten an Stelle der Enzymaktivität Wasser. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (2 % SDS, 45 mmol/l ATP, 1,3 mmol/l c-AMP pH 7,5) beendet.

Cyclische Nucleotide: c-AMP und c-GMP

c-AMP wurde nach Gilman (1970) mit c-AMP-bindendem Protein (Amersham-Buchler), c-GMP nach Steiner et al. (1972) radioimmunologisch (Amersham-Buchler) bestimmt.
Frierstopp-Gewebe wurde pulverisiert und mit 0,6 mol/l $HClO_4$ enteiweißt, neutralisiert ($KHCO_3$ 2 mol/l) und zentrifugiert (10 min., 1000xg). Der Überstand wurde lyophilisiert.
Nach Aufnahme des Lyophilisates in einem definierten Volumen wurde c-AMP und c-GMP nach dem angegebenen Verfahren bestimmt. Die Wiederfindungsrate wurde mittels ^{3}H-c-AMP bzw. ^{3}H-c-GMP bestimmt und die experimentellen Werte dementsprechend korrigiert.

4. Chemikalien

Urethan, Merck, Darmstadt
Heparin (Liquemin) Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz
Phenyläthylamin, Zinsser, Frankfurt

Streptozotocin, Boehringer Mannheim

Szintillationslösung (Quickszint 212) Zinsser, Frankfurt

Coenzyme und Enzyme für enzymatische Bestimmungen, Boehringer Mannheim

Insulin-RIA, Serono, Braintree, Mass., USA

Dowex 1x10 (Cl^-, 200 - 400 mesh), Biorad, Mass., USA

Dowex 2x8 (Cl^-, 50 - 100 mesh), Biorad, Mass., USA

Insulin, Hoechst, Frankfurt

Glucagon, Serva, Heidelberg

Adrenalin, Hoechst, Frankfurt

Propranolol, ICI, Planckstadt

Reserpin, CIBA, Basel

POCA, Dr. Schudt, BYK-Gulden, Konstanz

D-(U-^{14}C)-Glucose, New England Nuclear, Boston, Mass., USA

Um die Untergrund-Radioaktivität der radioaktiven Glucose zu reduzieren, wurde diese durch Chromatographie an Dowex 2x8, Cl^-, Elution mit H_2O) gereinigt.

Glycerol-^{14}C-triolein, Amersham-Buchler, Braunschweig

Radioaktives Triolein wurde vor Gebrauch zur Entfernung von Verunreinigungen an Mono- und Diglyceriden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel (Kieselgel 60, Merck, Darmstadt) mit Heptan/Diäthyläther/Eisessig (40/20/1 v/v/v) gereinigt. Die Triolein Fraktion wurde mit Toluol eluiert und unter N_2 konzentriert.

Triolein, Fluka, Basel, Schweiz

Triheptadecanoat, Heptadecanoat, Eicosadienat, Applied Sciences, Heidelberg

TCL plates Kieselgel 60, Merck, Darmstadt

Albumin (Cohn V Fraktion) entfettet, Serva, Heidelberg

Carnitinderivate, Serva, Heidelberg

Elutionsmittel:

Heptan, Diäthyläther, Essigsäure, Toluol, Merck, Darmstadt

Folin-Ciocalteau Reagenz, Merck, Darmstadt
Triton X100, Serva, Heidelberg
4-Methylumbelliferon und 4-Methylumbelliferyloleat, Serva, Heidelberg
^{14}C-Pyruvat, Amersham-Buchler, Braunschweig
DL-^{3}H-Methylcarnitin, Amersham-Buchler, Braunschweig
Palmitoylcarnitin, CoA, Acetyl-CoA, Serva, Heidelberg
DTT, Boehringer Mannheim
^{14}C-Glucose-1-Phosphat, UDP-^{14}C-Glucose, ^{14}C-ATP, 8-^{3}H-c-AMP, 8-^{3}H-c-GMP, Amersham-Buchler, Braunschweig
SDS, c-AMP, c-GMP, Serva, Heidelberg
c-AMP-binding protein, c-GMP-antibody, Amersham-Buchler, Braunschweig

Alle weiteren, nicht aufgeführten Chemikalien waren von p.a. Qualität und können von Merck (Darmstadt), Boehringer (Mannheim) oder Serva (Heidelberg) bezogen werden.

5. Berechnungen und Statistik

Myokardiale Substrate und Coenzyme wurden in µmol/g FG oder nmol/g FG angegeben. Um die perfusionsbedingte Zunahme des myokardialen Wassergehaltes zu berücksichtigen, wurden die Meßwerte auf der Basis des Proteingehaltes mg/g FG korrigiert. Angegeben sind jeweils Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm$ SEM). Sofern keine Zeitabhängigkeit dargestellt wurde, ergaben sich die tabellierten Werte aus Mittelung von Einzelwerten zu folgenden Zeitpunkten:

P1 = 21/23/25 min.
P2 = 36/38/40/42/44/45 min.

Statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test nach Student bzw. Wilcoxon berechnet. $p < 0{,}05$ wurde als Signifikanzgrenze angenommen.

C ERGEBNISSE

1. Charakterisierung des SZ-Diabetes der Wistar-Ratten.
Untersuchungen am nicht-perfundierten Herzen.

SZ-Diabetes:

Streptozotocin (100 mg/kg Körpergewicht) führte 3 Tage nach Applikation zu einer akuten diabetischen Stoffwechselstörung, die durch Hyperglykämie, Glucosurie, Ketonämie, Ketonurie sowie deutlich reduzierte Insulin-Plasmaspiegel charakterisiert war. Zusätzlich wurden ein rascher Verlust an Körpergewicht (- 56 ± 4 g, n = 11) und eine Hypertriglyceridämie beobachtet (Tab. 3, 4) („SZ-Diabetes", Akuter Diabetes).

Gruppe	Blutglucose	n
Kontrolle	7,8 ± 3,5	5
akuter Diabetes	19,1 ± 1,2 *	12
Insulin behandelt	6,6 ± 1,4	12

Tab. 3: Nüchternblutzuckerspiegel im SZ-Diabetes (mmol/l). Ratten wurde 100 mg SZ/kg appliziert und der Blutzucker 3 Tage später nüchtern bestimmt. $\bar{x}$ ± SEM, * $p < 0,05$ Diabetes vs. Kontrolle

Parameter	Kontrolle	akuter Diabetes
Acetoacetat (mmol/l)	0,12 ± 0,01	2,28 ± 0,13 *
ß-OH-Butyrat (mmol/l)	0,61 ± 0,05	7,39 ± 0,28 *
Triglyceride (mg/dl)	47 ± 3	1138 ± 515 *
Insulin (µU/ml)	39 ± 4	16,5 ± 0,7 *

Tab. 4: Ketonkörper, Triglyceride und Insulin im Serum SZ-diabetischer Ratten (100 mg/kg SZ). Angegeben sind $\bar{x}$ ± SEM, n = 10-14, * $p < 0,05$.

Insulin-Behandlung (4 I.U./Tag) über 5 Tage führte zu einer Normalisierung der Blutglucose und verhinderte das Auftreten von Glucosurie, Ketonurie und den Verlust an Körpergewicht.

Untersuchungen an nicht-perfundierten Herzen:

Um den Einfluß von SZ-Diabetes auf den myokardialen Metabolismus unter „in vivo" Bedingungen und die metabolische Ausgangslage vor Perfusionsbeginn zu charakterisieren, wurden Herzen von Kontroll- und SZ-Diabetes-Ratten in situ gefriergestoppt und der Energiestatus, der myokardiale Gehalt einiger Metabolite des Glucosestoffwechsels sowie die myokardialen Lipide und ihre Fettsäurezusammensetzung bestimmt.

(a) Energiestatus:

Wie aus Tab. 5 zu ersehen ist, führte die Induzierung eines SZ-Diabetes zu einer Reduktion des myokardialen Gehaltes an energiereichen Phosphaten. ATP nahm um 17,4 % und Creatinphosphat um 38,8 % ab. Die Verschlechterung des Energiezustandes im diabetischen Herzen spiegelte sich auch in der Verminderung des ATP/ADP- sowie des CP/C-Quotienten. Die Summe der Adeninnucleotide sowie die Summe (CP + Creatin) war um 12 % erniedrigt. Während der ADP-Gehalt im SZ-diabetischen Herzen nicht signifikant von dem der Kontrollen unterschieden war, nahm AMP im SZ-diabetischen Herzen um 34,9 % zu.

(b) Glucosestoffwechsel:

Veränderungen der untersuchten myokardialen Metabolite nach Induktion eines SZ-Insulinmangel-Diabetes sind in Tab. 6 dargestellt.

Glucose-6-Phosphat (G6P), α-Glycerinphosphat (α-GP), Lactat und Citrat waren im SZ-diabetischen Herzen gegenüber der Kontrolle 2-3-fach erhöht, während Pyruvat, Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)

	Kontrolle (µmol/g FG)	Diabetes (µmol/g FG)	Δ %
ATP	4,15 ± 0,11	3,45 ± 0,14 *	- 17,4
ADP	0,98 ± 0,03	0,91 ± 0,03	- 7,1
AMP	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02 *	+ 34,9
ΣAdeninnucleotide	5,25 ± 0,08	4,61 ± 0,12 *	- 12,3
CP	5,74 ± 0,36	3,50 ± 0,32 *	- 38,8
C	6,85 ± 0,26	7,49 ± 0,40	+ 9,3
ΣCP + C	12,59 ± 0,27	11,06 ± 0,36	- 12,2
ATP/ADP	4,40 ± 0,21	3,87 ± 0,21 *	
CP/C	0,90 ± 0,07	0,48 ± 0,09 *	
CP/ATP	1,37 ± 0,06	0,88 ± 0,06 *	

Tab. 5: Einfluß von SZ-Diabetes auf den Gehalt an energiereichen Phosphaten in nicht-perfundierten, gefriergestoppten Herzen. $\bar{x}$ ± SEM, * $p < 0,05$, n = 10-15

und Fructose-1,6-bisphosphat (FDP) nicht signifikant beeinflußt wurden. Daraus ergab sich eine Erhöhung des G6P/FDP-Verhältnisses von 16,2 auf 87,5, des α-GP/DHAP-Quotienten von 2,2 auf 5 und des Lactat/Pyruvat-Quotienten von 13 auf 55,9. Der Anstieg von Glucose-6-P (G6P) relativ zu Fructose-bisphosphat (FDP) im Herzen deutet auf eine Hemmung der Phosphofructokinase-Reaktion im SZ-Diabetes hin. Die Veränderungen im L/P- bzw. α-GP/DHAP-Verhältnis lassen auf eine Beeinflussung des cytosolischen Redoxstatus durch die diabetische Stoffwechsellage schließen.

Das Verhältnis der aktiven Pyruvatdehydrogenase (PDH_a) zur Gesamtaktivität (PDH_a/PDH_{a+b}) erniedrigte sich von 48,3 ± 3,4 (Kontrollherzen) auf 27,7 ± 2,2 % in SZ-diabetischen Rattenherzen (Tab. 7), d.h. bei unveränderter Gesamt-PDH-Aktivität wurde im SZ-Diabetes der PDH-Komplex desaktiviert bzw. inhibiert.

	Kontrolle (nmol/g FG)	Diabetes (nmol/g FG)	Δ %
Glucose-6-P	359 ± 49	1134 ± 87 *	+ 216
FDP	22 ± 2	36 ± 12	+ 64
α-GP	20 ± 5	62 ± 12 *	+ 210
DHAP	9 ± 1	15 ± 4	+ 67
Pyruvat	51 ± 8	38 ± 5	+ 25
Lactat	643 ± 63	1683 ± 288 *	+ 162
Citrat	746 ± 53	1096 ± 98 *	+ 47
Glucose-6-P/FDP	16,2 ± 2,3	87,5 ± 25 *	
α-GP/DHAP	2,3 ± 0,3	5,0 ± 0,9 *	
Lactat/Pyruvat	13,2 ± 1,4	55,9 ± 14 *	

Tab. 6: Einfluß von SZ-Diabetes auf intrakardiale Metabolite in nicht-perfundierten, gefriergestoppten Rattenherzen. $\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0,05$.

Pyruvatdehydrogenase-Aktivität (nmol/min · g FG)		
	Kontrolle	Diabetes
PDH_a	2605 ± 226	1440 ± 95 *
PDH_{a+b}	5410 ± 337	5088 ± 296
PDH_a/PDH_{a+b} (%)	48,3 ± 3,4	27,7 ± 2,2 *

Tab. 7: Pyruvatdehydrogenase-Aktivität (nmol/min · g FG) in nicht-perfundierten Rattenherzen. $\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0,05$

Der Gehalt an Glycogen betrug im SZ-diabetischen Herzen 47,5 ± 1,6 ($n = 11$), in Kontrollherzen 19,6 ± 1,9 ($n = 16$) µmol/g FG ($p < 0,05$).

(c) Myokardiale Lipide:

Zur Untersuchung des Einflusses von SZ-Diabetes auf die myokardialen Lipide wurden die Fraktionen der Triglyceride, Phospholipide und freien Fettsäuren isoliert und das Fettsäuremuster dieser Fraktionen gaschromatographisch bestimmt. Freie Fettsäuren umfaßten nur einen sehr geringen Anteil (weniger als 1 %) der gesamten Fettsäureacylreste myokardialer Lipide (Tab. 8). In SZ-diabetischen Rattenherzen war der Gehalt an freien Fettsäuren im Vergleich zu Kontrollen erhöht (+ 25 %). Der Anstieg der freien Fettsäure-Fraktion war in erster Linie auf eine Erhöhung der Palmitin-, Öl- und Linolsäure zurückzuführen. Während sich der prozentuale Anteil der Linolsäure nahezu verdoppelte, nahm der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Linolen- und Arachidonsäure) fast um die Hälfte ab (Tab. 10).

Fettsäureacylreste in:	Kontrolle (nmol/g FG)	Diabetes (nmol/g FG)
Freie Fettsäuren	183 ± 11	230 ± 15 *
Triglyceride	5341 ± 1177	17373 ± 551 *
Phospholipide	41287 ± 1226	41303 ± 1343 *

Tab. 8: Gehalt an Freien Fettsäuren, Triglyceriden und Phospholipiden in Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten. $\bar{x} \pm$ SEM, n = 6 pro Gruppe, $p < 0{,}05$ Diabetes vs. Kontrollen*

Triglyceride stellten in Kontrollen 31 %, im SZ-diabetischen Herzen hingegen 55 % der gesamten Glyceride dar (Tab. 9). Wie die Gesamtglycerid-Fraktion war der Triglycerid-Gehalt im SZ-diabetischen Herzen 3-fach gegenüber der Kontrolle erhöht (Tab. 8, 9) und stellte in Kontrollen 11 %, im SZ-diabetischen Herzen 29,5 % der gesamten Fettsäureacylreste dar (Tab. 8).

Mono- und Diglyceride konnten dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden (Vergleich mit Standards), repräsentierten aber nur im Vergleich zur Triglycerid-Fraktion einen quantitativ nicht erfaßbaren Anteil.
Die absoluten und relativen Veränderungen des Fettsäuremusters der chromatographierten Triglycerid-Fraktion sind in Tab. 11 dargestellt. Im SZ-Diabetes war der Gehalt an Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure in der Triglycerid-Fraktion erhöht. Aus der relativen Zusammensetzung folgt eine Zunahme des Anteils von Öl- und Linolsäure, sowie eine relative Abnahme aller anderen Fettsäuren der myokardialen Triglycerid-Fraktion.

Die myokardialen Phospholipide enthielten in Kontrollen 90 %, im SZ-Diabetes 70 % der gesamten Fettsäureacylreste (Tab. 12).
SZ-Diabetes hatte nur geringen Einfluß auf die Menge der myokardialen Phospholipide als auch auf ihre Fettsäure-Zusammensetzung (Tab. 12).

Lipidfraktion	Kontrolle		Diabetes	
	(µmol/g FG)	%	(µmol/g FG)	%
Gesamtglyceride	5,8 ± 0,6	100	10,6 ± 0,5 *	100
nicht-Triglycerid-glycerid	4,0 ± 0,3	69	4,8 ± 0,5	45
Triglyceride	1,8 ± 0,4	31	5,8 ± 0,2 *	55

Tab. 9: Glyceride im Herzen von Kontroll- und SZ-diabetischen Rattenherzen.
$\bar{x} \pm$ SEM (n = 6 pro Gruppe), * $p < 0,05$

Fettsäuren	Kontrolle	Diabetes		Kontrolle	Diabetes	
	Fettsäureacylreste (nmol/g FG)	Fettsäureacylreste (nmol/g FG)	Diab./Kontr.	% der Summe	% der Summe	Δ %
C 14	12,0 ± 1,5	10,1 ± 1,3	0,84	6,3 ± 0,5	4,3 ± 0,4 *	-31 *
C 15	9,3 ± 0,6	5,5 ± 0,5 *	0,6 *	4,8 ± 0,3 *	2,5 ± 0,2 *	-48 *
C 16	66,2 ± 3,7	85,3 ± 4,5 *	1,29 *	36,4 ± 1,8	37,2 ± 0,8	+ 2
C 16:1	11,9 ± 1,6	10,0 ± 3,9	0,84	5,9 ± 0,7	4,0 ± 1,6	-32
C 18	32,7 ± 2,3	37,3 ± 1,8	1,14	20,0 ± 2,7	16,3 ± 0,9	-18
C 18:1	23,9 ± 3,2	38,2 ± 3,3	1,59 *	13,0 ± 1,4	16,5 ± 0,7	+27
C 18:2	22,2 ± 2,8	42,6 ± 4,0	1,92 *	9,4 ± 2,8	18,3 ± 0,8 *	+95 *
C 18:3	3,0 ± 1,0	2,2 ± 0,2	0,73	1,6 ± 0,4	0,8 ± 0,1 *	-48 *
C 20:3	Spuren	Spuren				
C 20:4	8,4 ± 1,1	5,5 ± 0,5 *	0,66 *	4,3 ± 0,7	2,5 ± 0,4 *	-42 *
Summe	183,7 ± 11,4	230,5 ± 15,1 *	1,25 *			

Tab. 10: Einfluß von SZ-Diabetes auf die Fettsäurezusammensetzung der freien Fettsäuren im Rattenherzen.
a) absolute Werte, b) prozentualer Anteil der einzelnen Fettsäuren an der Gesamtfraktion.
* $p < 0,05$, $n = 5-6$ $\bar{x} \pm SEM$

Fettsäuren	Kontrolle	Diabetes		Kontrolle	Diabetes	
	Fettsäureacylreste (nmol/g FG)	Fettsäureacylreste (nmol/g FG)	Diab./Kontr.	% der Summe	% der Summe	Δ%
C 14	132 ± 33	184 ± 27	1,4	2,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1 *	-48*
C 15	31 ± 4	58 ± 7 *	1,92 *	0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1 *	-60*
C 16	1806 ± 378	5228 ± 271 *	2,9 *	34,1 ± 0,9	30,3 ± 0,8 *	-11*
C 16:1	261 ± 72	457 ± 100	1,76	4,4 ± 0,6	2,6 ± 0,4 *	-41*
C 18	417 ± 65	1170 ± 60 *	2,81 *	8,5 ± 0,8	6,9 ± 0,4	-19
C 18:1	1098 ± 247	4529 ± 191 *	4,12 *	20,7 ± 0,6	26,0 ± 0,3 *	+26*
C 18:2	1415 ± 370	5419 ± 167 *	3,83 *	25,4 ± 1,6	30,6 ± 1,0 *	+20*
C 18:3	57 ± 21	103 ± 22	1,8	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	-25
C 20:3	Spuren	Spuren		Spuren	Spuren	
C 20:4	123 ± 13	168 ± 18	1,37	2,8 ± 0,6	1,2 ± 0,2	-57
Summe	5341 ± 1178	17373 ± 551 *	1,37 *			

Tab. 11: Einfluß von SZ-Diabetes auf die Fettsäurezusammensetzung der myokardialen Triglyceride.
a) absolute Werte, b) prozentualer Anteil der einzelnen Fettsäuren an der Gesamtfraktion
$\bar{x}$ ± SEM, * $p < 0,05$ Diabetes vs. Kontrolle

Fettsäuren	Kontrolle	Diabetes		Kontrolle	Diabetes	
	Fettsäureacylreste (nmol/g FG)	Fettsäureacylreste (nmol/g FG)	Diab./Kontr.	% der Summe	% der Summe	Δ%
C 14	63 ± 9	75 ± 20	1,19	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,1	+ 31
C 15	443 ± 224	716 ± 72	1,61	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1 *	+ 54 *
C 16	5757 ± 208	5002 ± 200 *	0,87 *	13,8 ± 0,4	12,1 ± 0,2 *	- 13 *
C 16:1	108 ± 7	134 ± 27	1,24	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,1	-
C 18	10036 ± 404	10313 ± 351	1,03	24,3 ± 0,3	25,1 ± 0,4	+ 3
C 18:1	2486 ± 284	2570 ± 137	1,03	6,0 ± 0,5	6,2 ± 0,3	+ 3
C 18:2	13825 ± 257	14398 ± 1079	1,04	33,2 ± 0,7	34,7 ± 1,6	+ 4
C 18:3	83 ± 11	82 ± 10	1,02	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,02	-
C 20:3	250 ± 39	211 ± 12	1,12	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,04	-
C 20:4	8455 ± 230	8334 ± 545	0,99	20,8 ± 0,4	20,1 ± 1,1	- 3
Summe	41287 ± 1227	41303 ± 1343	1,0			

Tab. 12: Einfluß von SZ-Diabetes auf die Fettsäurezusammensetzung der myokardialen Phospholipide. a) absolute Werte, b) prozentualer Anteil der einzelnen Fettsäuren an der Gesamtfraktion $\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0,05$ Diabetes vs. Kontrolle

Eine mildere Verlaufsform des SZ-Diabetes wurde durch Applikation von 60 mg/kg SZ erreicht. Gekennzeichnet war diese Form des SZ-Diabetes durch Hyperglykämie, Glucosurie und einen reduzierten Insulin-Plasmaspiegel. Ketonurie trat unter diesen Bedingungen nicht auf. Die Herzen wurden 4 - 5 Wochen nach SZ-Applikation untersucht („Chronischer Diabetes").

Die Veränderungen im myokardialen Gehalt der freien Fettsäuren und der Phospholipide sowie die Fettsäurezusammensetzung dieser Fraktionen waren im chronischen Diabetes ähnlich wie sie in der ketoazidotischen Form des SZ-Diabetes („Akuter Diabetes", 3 Tage nach Applikation von SZ) beobachtet wurden (Tab. 13).

Die Erhöhung des myokardialen Triglyceridgehaltes trat im chronischen Diabetes nicht auf und ist somit an ketotische Stoffwechselbedingungen gebunden.

Freie Fettsäuren	Fettsäureacylreste (nmol/g FG)	chron.Diab./Kontr.	% der Summe	%
C 14	13,0 ± 2,4	1,08	4,8 ± 0,4 *	-24 *
C 15	28,4 ± 8,2 *	3,06 *	10,9 ± 2,2 *	126 *
C 16	87,4 ± 16,4	1,32	32,3 ± 2,2	-11
C 16:1	5,0 ± 1,2 *	0,42 *	1,8 ± 0,3 *	-70 *
C 18	50,5 ± 4,7 *	1,55 *	18,3 ± 1,2	-9
C 18:1	31,7 ± 3,4	1,32	11,4 ± 0,4 **	-13
C 18:2	40,2 ± 1,7 *	1,81 *	14,9 ± 1,3 *	59 *
C 18:3	3,5 ± 0,8	1,16	1,3 ± 0,3	-19
C 20:3	Spuren			
C 20:4	11,8 ± 2,2	1,41	4,5 ± 1,0	5
Summe	282,0 ± 37,0 *	1,53 *		
Triglyceride				
C 14	107 ± 40	0,81	1,8 ± 0,3	-24
C 15	83 ± 16 *	2,76 *	1,7 ± 0,6 *	93 *
C 16	1651 ± 376 **	0,91	29,8 ± 0,9 *	-13 *
C 16:1	146 ± 72 **	0,56	2,2 ± 0,6 *	-50 *
C 18	1745 ± 80 **	1,07	8,4 ± 0,9	-1
C 18:1	1224 ± 280 **	1,11	21,9 ± 0,9 **	6
C 18:2	1656 ± 278	1,17	30,9 ± 1,0 *	21 *
C 18:3	70 ± 15	1,23	1,3 ± 0,1 **	36
C 20:3	Spuren			
C 20:4	95 ± 19	0,77	2,1 ± 0,4	-26
Summe	5479 ± 1109	1,03		
Phospholipide				
C 14	46 ± 1	0,73	0,1 ± 0,01	-29
C 15	70 ± 7	0,16 *	0,2 ± 0,01 *	-87 *
C 16	5784 ± 279	1,0	13,2 ± 0,5 **	-5
C 16:1	84 ± 13	0,78	0,2 ± 0,02**	-34
C 18	11481 ± 322	1,14 *	26,2 ± 0,5 *	8 *
C 18:1	2712 ± 132	1,09	6,2 ± 0,3	3
C 18:2	14514 ± 484	1,05	33,1 ± 0,3	0,3
C 18:3	85 ± 10	1,02	0,2 ± 0,02	-
C 20:3	282 ± 51	1,12	0,6 ± 0,1	-
C 20:4	8780 ± 280	1,04	20,0 ± 0,5	-4
Summe	43838 ± 1206	1,06		

Tab. 13: Einfluß von „chronischem Diabetes" auf die Fettsäurezusammensetzung der myokardialen Lipidfraktionen.
$\bar{x} \pm$ SEM, n = 5-6, * $p < 0,05$ Kontrolle vs. Diabetes

Zusammengefaßt ergibt sich:

(1) Energiereiche Phosphate: Im SZ-Diabetes sind die energiereichen Phosphate ATP (- 17,4 %) und Creatinphosphat (- 38,8 %) verringert. Gleichzeitig verminderte sich die Summe der Adeninnucleotide.

(2) Metabolite: Die stationären Konzentrationen von Glucose-6-P, α-Glycerin-P, Lactat und Citrat sind im SZ-diabetischen Herzen im Vergleich zur Kontrolle 2-3-fach erhöht. Im SZ-Diabetes betrug das Verhältnis Glucose-6-P/Fructose-1,6-bisphosphat 87,5, in Kontrollherzen 16.

(3) Glycogen: Der Glycogengehalt war im SZ-diabetischen Herzen verdoppelt.

(4) Triglyceride: Der Triglyceridgehalt des diabetischen Rattenherzens war unter ketoazidotischen Bedingungen verdoppelt, nicht jedoch im „chronischen Diabetes".

(5) Freie Fettsäuren: Der Gehalt an freien Fettsäuren stieg im Diabetes um 25 % von 155 auf 215 nmol/g FG an.

(6) Fettsäurezusammensetzung: Die Fettsäurezusammensetzung der freien Fettsäure- und Triglycerid-Fraktion wies eine prozentuale Zunahme der gesättigten bzw. ein- und zweifach-ungesättigten Fettsäuren auf. Der prozentuale Anteil der mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (Linolen- und Arachidonsäure) nahm ab.

(7) Phospholipide: Die Phospholipid-Fraktion war im SZ-Diabetes weder qualitativ noch quantitativ verändert.

(8) NAD/NADH: Aus dem Lactat- und Pyruvat-Gehalt des Herzens ergibt sich ein NAD/NADH-Quotient in Kontrollen von 793, Im SZ-Diabetes war der Redoxstatus erniedrigt (NAD/NADH = 205).

Es ist somit zu vermuten, daß im nicht-perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten Ketonkörper das wichtigste Substrat des myokardialen Energiestoffwechsels darstellen. Die Hemmung des glycolytischen Umsatzes von Glucose, die beobachtete Akkumulation von Glycogen sowie die vermehrte Synthese von Triglyceriden wären als Folge des Substrat-

angebotes unter ketoazidotischen Bedingungen zu verstehen. Trotz erhöhter Konzentrationen an endogenen Substraten wie Glycogen und Triglyceriden ist der myokardiale Energiestoffwechsel gestört, worauf der im SZ-diabetischen Herzen verminderte Gehalt an energiereichen Phosphaten (ATP und CP) hinweist.

2. Das isoliert-perfundierte Herz SZ-diabetischer Ratten.

(a) Charakterisierung der Funktionseigenschaften sowie des Energiestatus.

Funktionseigenschaften des perfundierten Herzens

Herzen von Kontrolltieren zeigten über eine Perfusionsdauer von 45 min. keine signifikanten Veränderungen der Parameter Kontraktilität, Frequenz, dp/dt_{max} und linksventrikulärer Druck. Dies folgt aus dem Vergleich dieser Parameter gemessen zu Beginn und am Ende der Perfusion (Periode 1 (P 1) = 21.-25. min., Periode 2 (P 2) = 36.-45. min.). Das isoliert-perfundierte Herz zeigte somit eine ausgezeichnete Stabilität hinsichtlich seiner Funktionalität (Tab. 14). Während der koronare Fluß und die Druckanstiegsgeschwindigkeit weder durch Insulin noch durch eine Erhöhung der Glucose-Konzentration von 5 auf 11 mmol/l im Perfusionsmedium beeinflußt wurden, nahm im Verlauf der Perfusion von Kontrollherzen die Sauerstoffaufnahme bei 11 mmol/l Glucose leicht zu. Insulin (5 U/l) hatte eine geringe Beschleunigung der Herzfrequenz bei niedrigem Glucoseangebot zur Folge. Der Sauerstoffverbrauch pro Herzschlag betrug zwischen 15 und 20 nmol O_2/Schlag, was unter der Annahme eines P/O-Quotienten von 3 einer ATP-Produktion von 90 bis 120 nmol/Schlag entspricht.
Während sich Sauerstoffverbrauch und Herzfrequenz im isoliert-perfun-

dierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten nicht unterschieden, war der koronare Fluß im SZ-diabetischen Herzen in Abhängigkeit von den Substrat- und Versuchsbedingungen um 17 bis 40 % erhöht. Weiterhin war dp/dt_{max} als Maß für die Kontraktilität des Herzens zu Beginn der Perfusionszeit in Abwesenheit von Insulin deutlich reduziert (Periode 1: -9 bzw. -13 %), stieg aber im Verlauf der Perfusion an, so daß nach 45-minütiger Perfusion kein signifikanter Unterschied mehr zwischen SZ- und nicht-diabetischen Herzen bestand (Abb. 3). Die Verdoppelung der Glucosekonzentration im Perfusat hatte keinen Einfluß auf die funktionellen Parameter des SZ-diabetischen Herzens.

Energetik:

Der Einfluß der experimentellen Versuchsbedingungen auf den Gehalt an energiereichen Phosphaten im Herzgewebe ist in Tab. 15 u. 16 und Abb. 4 dargestellt.

Im Vergleich zu nicht-perfundierten Kontrollherzen führte die Perfusion mit Glucose als einzigem Substrat in Abwesenheit von Insulin zu einer Verminderung des ATP/ADP-Verhältnisses von 4,4 $\pm$ 0,2 auf 3,2 $\pm$ 0,1 sowie von Creatinphosphat um 35 %. Das Creatinphosphat/Creatin-Verhältnis verringerte sich entsprechend von 0,9 auf 0,34. Durch Insulin konnte dieser perfusionsbedingte Verlust an energiereichen Phosphaten in Kontrollherzen vermieden werden, das ATP/ADP-Verhältnis erhöhte sich auf 4,7, der CP/C-Quotient auf 0,72. Unter den experimentellen Bedingungen - Glucose als einziges exogenes Substrat - ist die Energiegewinnung aus Glucose offensichtlich für das Kontrollherz absolut notwendig, die endogenen Substrate wie Glycogen und Triglyceride reichen nicht aus, um die Energiebilanz auszugleichen. Weiterhin ist die notwendige Metabolisierung von Glucose nur in Gegenwart von Insulin in ausreichendem Maße möglich. Die Verdoppelung der Glucose-Konzentration im Perfusionsmedium hatte keinen Einfluß auf den Energiezustand des Herzens.

			Kontrolle				Diabetes			
	Glucose	Insulin	Periode 1	(n)	Periode 2	(n)	Periode 1	(n)	Periode 2	(n)
Herzfrequenz	5 mM	-	255 ± 6	(17)	254 ± 7	(17)	262 ± 8	(12)	249 ± 8	(12)
(Schläge/min)	5 mM	+	278 ± 8	(13)[2]	277 ± 8	(13)[2]	273 ± 7	(13)	264 ± 7	(13)
	11 mM	-	263 ± 6	(22)	236 ± 6	(22)	245 ± 7	(22)	229 ± 6	(22)
	11 mM	+	280 ± 11	(12)	265 ± 8	(12)	260 ± 12	(13)[1,3]	240 ± 10	(13)[3]
Coronarer Fluß	5 mM	-	8,9 ± 0,4	(17)	8,6 ± 0,3	(11)	12,6 ± 0,7	(11)[1]	11,9 ± 0,8	(12)
(ml/min)	5 mM	+	8,7 ± 0,4	(12)	8,5 ± 0,5	(7)	11,7 ± 0,9	(13)[1]	11,8 ± 1,0	(13)
	11 mM	-	8,2 ± 0,3	(22)	8,0 ± 0,5	(22)	9,6 ± 0,6	(20)	9,7 ± 0,6	(20)
	11 mM	+	7,9 ± 0,3	(12)	8,0 ± 0,3	(12)	10,9 ± 0,8	(13)[1]	10,6 ± 0,8	(13)
Sauerstoffver-	5 mM	-	115 ± 6	(22)	112 ± 5	(22)	112 ± 5	(12)	114 ± 4	(12)
brauch	5 mM	+	121 ± 10	(16)	109 ± 7	(20)	114 ± 6	(12)	124 ± 9	(12)
(µl/min)	11 mM	-	90 ± 3,2	(22)	100 ± 5	(22)[4]	106 ± 3,7	(20)	110 ± 4,9	(20)
	11 mM	+	93 ± 4	(12)	106 ± 5	(12)	106 ± 5,1	(13)	112 ± 4,9	(13)
dp/dt_{max}	5 mM	-	976 ± 29	(17)	1041 ± 40	(19)	893 ± 33	(12)[1]	968 ± 36	(12)[4]
(mm Hg/sec)	5 mM	+	986 ± 25	(20)	1040 ± 46	(20)	912 ± 28	(13)	1017 ± 2	(13)[4]
	11 mM	-	1005 ± 15	(22)	1014 ± 23	(22)	870 ± 17	(22)[1]	1013 ± 24	(22)[4]
	11 mM	+	979 ± 18	(12)	1024 ± 55	(12)	887 ± 37	(13)	1023 ± 49	(13)

Tab. 14: Funktionsparameter von Kontroll- und SZ-diabetischen Herzen in Abhängigkeit von Perfusionsdauer (P 1: 21.-25. min., P 2: 36.-45. min.), der Glucosekonzentration im Perfusionsmedium und von Insulin.
$\bar{x}$ ± SEM, 1 $p < 0,05$ Diabetes vs. Kontrolle, 2 $p < 0,05$ ± Insulin, 3 $p < 0,05$ Glucose 5 vs. 11 mmol/l, 4 $p < 0,05$ P 1 vs. P 2.

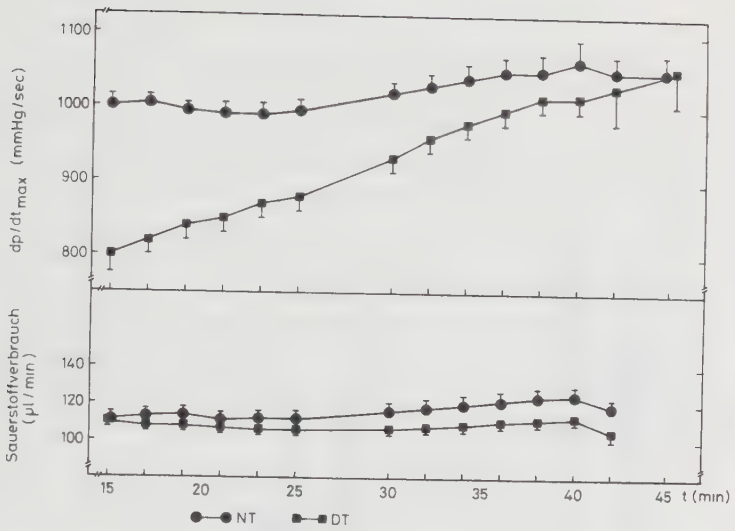


Abb. 3: Zeitabhängigkeit von dp/dt_{max} sowie des Sauerstoffverbrauchs in Herzen von Kontroll- (●) und SZ-diabetischen Ratten (■).
Glucose 11 mmol/l, $\bar{x} \pm$ SEM.

In perfundierten SZ-diabetischen Herzen wurde ein Verlust an energiereichen Phosphaten in Form von ATP beobachtet, während sich der Gehalt an AMP und ADP in Kontrollherzen und SZ-diabetischen Herzen nicht signifikant unterschied. Die Summe der Adeninnucleotide war insgesamt um etwa 20 % erniedrigt (Abb. 5). Während bei Kontrollherzen Insulin zu einer Normalisierung des ATP-Gehaltes führte, hatte im SZ-Diabetes weder Insulin noch die Verdoppelung des Glucosekonzentration im Perfusat einen signifikanten Einfluß auf die Phosphorylierung der Adeninnucleotide (Tab. 15, Abb. 5).

Auffällig ist der hohe, myokardiale Creatinphosphat-Gehalt sowohl im Vergleich zu nicht-perfundierten, diabetischen Herzen als auch im Vergleich zu perfundierten Kontrollherzen. Dies verdeutlicht insbesondere

der CP/C-Quotient, der in Kontrollherzen bei 0,34 ± 0,03, in SZ-diabetischen Herzen aber bei 1,23 ± 0,08 bzw. 0,98 ± 0,08 lag (Tab. 15). Die Verminderung des Creatin-Gehaltes kann nur teilweise als Folge des hohen CP-Anteiles erklärt werden, da auch die Summe (CP + C) im SZ-diabetischen Herzen um 20 % verringert war.

SZ-Diabetes bedingte somit sowohl einen Verlust an Adeninnucleotiden als auch Verringerung des Creatin-Pools, der zur Phosphorylierung zur Verfügung steht. Während durch Perfusion der diabetischen Herzen mit Glucose unabhängig von Insulin der Gehalt an CP Kontrollwerte erreichte, blieb der A~P-Gehalt im SZ-diabetischen Herzen erniedrigt.

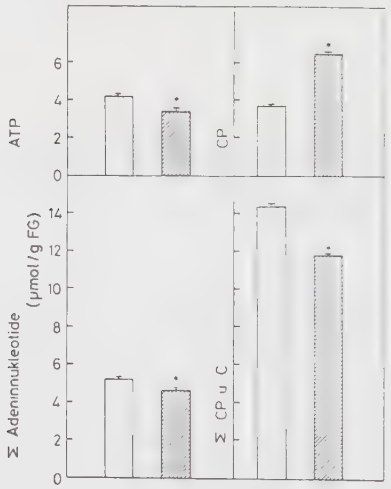


Abb. 4: Einfluß von SZ-Diabetes auf die energiereichen Phosphate ATP und CP sowie die Summe der Adeninnucleotide und (CP + C) im isoliert-perfundierten Rattenherzen.
Glucose 5 mmol/l, Perfusionsdauer 45 min., $\bar{x}$ ± SEM,
* $p < 0,05$

☐ Kontrolle ▨ Diabetes

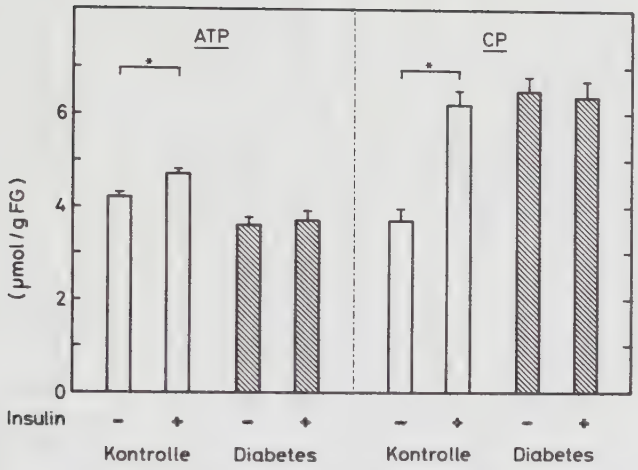


Abb. 5: Einfluß von Insulin auf den myokardialen Gehalt von ATP (links) und CP (rechts) in perfundierten Herzen von Kontroll- und SZ-diabetischen Ratten.
Glucose 5 mmol/l, Insulin 5 U/l, Perfusionsdauer 45 min., $\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0{,}05$.

	5 mM Glucose				11 mM Glucose			
	Kontrolle		Diabetes		Kontrolle		Diabetes	
Insulin	-	+	-	+	-	+	-	+
ATP	4,17 ± 0,07	4,70 ± 0,07[2]	3,63 ± 0,15	3,69 ± 0,23[1]	4,09 ± 0,13	4,29 ± 0,10[3]	3,10 ± 0,2[1,3]	3,53 ± 0,10[1]
ADP	1,33 ± 0,04	1,10 ± 0,04[2]	0,79 ± 0,03	1,09 ± 0,19	1,22 ± 0,04[3]	1,13 ± 0,05	0,73 ± 0,05[1]	0,81 ± 0,03[1]
AMP	0,19 ± 0,013	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01[1]	0,10 ± 0,01[1]	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,09 ± 0,06[1]	0,10 ± 0,01[1]
Summe	5,70 ± 0,10	5,94 ± 0,08	4,53 ± 0,16[1]	4,89 ± 0,24	5,48 ± 0,18	5,59 ± 0,16[1]	3,93 ± 0,25[1]	4,44 ± 0,11[1]
ATP/ADP	3,19 ± 0,10	4,36 ± 0,16[2]	4,62 ± 0,20[1]	4,12 ± 0,41	3,38 ± 0,10	3,86 ± 0,13[2]	4,21 ± 0,11[1]	4,39 ± 0,16
$\frac{ATP \cdot AMP}{ADP^2}$	0,45 ± 0,015	0,53 ± 0,03[2]	0,58 ± 0,03[1]	0,47 ± 0,062	0,44 ± 0,02	0,57 ± 0,02[2]	0,58 ± 0,04[1]	0,52 ± 0,03[1,2]
$\frac{ATP+\frac{1}{2}AMP}{\Sigma Ad.Nucl.}$	0,85 ± 0,004	0,88 ± 0,004[2]	0,89 ± 0,004[1]	0,86 ± 0,016	0,85 ± 0,01	0,87 ± 0,01	0,88 ± 0,08[1]	0,89 ± 0,01

Tab. 15: Einfluß von SZ-Diabetes, Glucosekonzentration und Insulin auf den myokardialen Gehalt an Adeninnucleotiden.
$\bar{x}$ ± SEM (µmol/g FG), 1 $p < 0,05$ Kontrolle vs. Diabetes, 2 $p < 0,05$ ± Insulin,
3 $p < 0,05$ Glucose 5 mmol/l vs. 11 mmol/l,
Perfusionsdauer 45 min.

	5 mM Glucose				11 mM Glucose			
	Kontrolle		Diabetes		Kontrolle		Diabetes	
Insulin	-	+	-	+	-	+	-	+
CP	3,710 ± 0,250	6,180 ± 0,320[2]	6,490 ± 0,380[1]	6,410 ± 0,290	4,17 ± 0,18	5,48 ± 0,19	5,49 ± 0,22[1]	5,79 ± 0,19
C	10,720 ± 0,290	8,970 ± 0,270[2]	5,400 ± 0,220[1]	5,940 ± 0,370[1]	10,28 ± 0,23	8,99 ± 0,42	5,97 ± 0,29[1]	5,66 ± 0,25[1]
CP+C	14,420 ± 0,380	14,980 ± 0,420	11,890 ± 0,430	12,350 ± 0,470	14,56 ± 0,36	14,71 ± 0,77	11,46 ± 0,40	11,45 ± 0,30
CP/C	0,335 ± 0,028	0,724 ± 0,052[2]	1,225 ± 0,081[1]	1,143 ± 0,104[1]	0,41 ± 0,02	0,62 ± 0,04[2]	0,98 ± 0,081	1,06 ± 0,08[1]

Tab. 16: Creatin und Creatinphosphat in perfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten in Abhängigkeit von der Konzentration an Glucose und Insulin.
$\bar{x}$ ± SEM (µmol/g FG), Perfusionsdauer 45 min.
1 $p < 0,05$ Kontrolle vs. Diabetes, 2 $p < 0,05$ ± Insulin,
3 $p < 0,05$ Glucose 5 mmol/l vs. 11 mmol/l.

(b) Metabolisierung von Glucose im isoliert-perfundierten Rattenherzen SZ-diabetischer Ratten.

Wie Untersuchungen an nicht-perfundierten Herzen zeigten, sind im SZ-diabetischen Rattenherzen sowohl die Glycogen- als auch die Triglyceridspeicher gegenüber Kontrollen 2-3-fach erhöht. Bei Perfusion der Herzen mit Glucose als dem einzigen exogenen Substrat war deshalb zu untersuchen, in welchem Ausmaße Glucose als exogenes Substrat bzw. die endogenen Substrate Glycogen und Triglyceride für die Bereitstellung der für die Herzaktion notwendigen Energie herangezogen werden.

Glucoseoxidation:

Die Glucoseoxidation wurde untersucht durch das Angebot radioaktiv markierter Glucose: U-^{14}C-Glucose. Kontrollherzen oxidierten in Abwesenheit von Insulin zu Beginn der Perfusion 160 nmol Glucose/min x g FG zu CO_2. Im Verlauf der Perfusion nahm die Oxidation exogener Glucose auf 200 nmol/min (P 2) zu, so daß 23 % des aufgenommenen Sauerstoffs für die Glucoseoxidation verbraucht wurde (Tab. 17). Erhöhung der Glucosekonzentration auf 11 mmol/l bedingte einen rascheren Glucoseumsatz. Insulin (5 U/l) steigerte die Glucoseoxidation bei niedriger Glucosekonzentration 2,7-, bei höherer Glucosekonzentration 1,8-fach, so daß im Langendorff-Herz maximal 600 nmol Glucose/min. oxidiert wurden. In Gegenwart von Insulin wurden 74-82 % des gesamten Sauerstoffbedarfs des Herzens für die Oxidation exogener Glucose verbraucht. Das Kontrollherz ist somit in der Lage, seinen Energiebedarf weitgehend durch die Metabolisierung von Glucose zu decken, Voraussetzung ist aber eine ausreichende Konzentration an Insulin.

Im Diabetes ist die Oxidation von exogener Glucose zu CO_2 gehemmt; unabhängig von der Glucosekonzentration wurden lediglich 40 - 50 nmol Glucose/min. zu CO_2 oxidiert. Damit entfielen im Diabetes nur 4-8 %

des gesamten kardialen Sauerstoffverbrauchs auf die Oxidation exogener Glucose. Insulin hatte keinen Einfluß auf die Glucoseoxidation im SZ-diabetischen Herzen. Das isoliert-perfundierte diabetische Rattenherz erwies sich somit als insulin-insensitiv hinsichtlich des Umsatzes von exogener Glucose zu CO_2.

Lactat- und Pyruvatabgabe:

Die geringe Oxidation von exogener Glucose zu CO_2 kann bedingt sein durch

a) eine limitierte Aufnahme von Glucose durch das Herz,
b) die Inhibierung eines enzymatischen Schrittes in der Glycolysekette und/oder
c) die Hemmung der Pyruvatoxidation, worauf die geringe Pyruvatdehydrogenase-Aktivität in nicht-perfundierten diabetischen Herzen hinweisen könnte.

Um zwischen diesen verschiedenen Möglichkeiten der Hemmung des kardialen Glucosestoffwechsels differenzieren zu können, wurde der Ausstrom von Lactat und Pyruvat in das coronare Effluat von Kontrollen und SZ-diabetischen Rattenherzen bestimmt.

Lactat:

In Abhängigkeit von der Glucosekonzentration lag der Lactatausstrom bei Kontrollherzen und einer Substrat-Glucosekonzentration von 5 mmol/l über die gesamte Perfusionszeit zwischen 100 - 150 nmol/min. Die Erhöhung der Perfusat-Glucose auf 11 mmol/l beschleunigte die Lactatfreisetzung auf 200 nmol/min. Ein Vergleich des Lactatausstromes in den beiden Meßperioden (P 1: 21.-25. min., P 2: 36.-45. min.) zeigt, daß sich hinsichtlich des Lactatausstromes in Kontrollherzen ein steady state einstellte; unter den genannten experimentellen Bedingungen blieb der Lactatausstrom während der Perfusionszeit konstant oder fiel leicht ab. Insulin führte bei niedriger Glucosekonzentration zu einem raschen Anstieg des Lactatausstromes auf das 10 - 12-fache des Vergleichswertes ohne Insulin und auf das 5-6-fache

Gruppe	Glucose	Insulin	Periode 1 (n)	Periode 2 (n)	% CO_2 (n)
Kontrolle	5 mM	-	159,8 ± 21,7 (9)	200 ± 25,6 (13)	22,7 ± 2,5 (13)
Kontrolle	5 mM	+	396,3 ± 25,7 (6) [2]	543 ± 37,0 (6)	74,3 ± 4,5 (7) [2 4]
Diabetes	5 mM	-	47,3 ± 13,6 (8) [1]	43 ± 7,6 (9) [1]	4,9 ± 0,8 (9)
Diabetes	5 mM	+	45,1 ± 11,2 (8) [1]	50 ± 11,4 (9) [1]	5,7 ± 1,8 (9) [1]
Kontrolle	11 mM	-	170,0 ± 12,0 (11)	339 ± 19,0 (11) [3 4]	37,8 ± 1,8 (11) [3 4]
Kontrolle	11 mM	+	396,0 ± 40,0 (7) [2]	614 ± 51,0 (7) [2 4]	81,8 ± 4,4 (7) [2 4]
Diabetes	11 mM	-	38,0 ± 5,0 (11) [1]	51 ± 7,0 (11) [1]	5,7 ± 0,6 (11) [1]
Diabetes	11 mM	+	45,0 ± 9,0 (9) [1]	68 ± 13,0 (11) [1]	7,5 ± 1,4 (11) [1]

Tab. 17: Oxidation exogener Glucose durch isoliert-perfundierte Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischer Ratten in Abhängigkeit von der Konzentration an Glucose, von Insulin und der Zeit (nmol Glucoseäquivalente/min x g FG).

$\bar{x}$ ± SEM, 1 $p < 0,05$ Kontrolle vs. Diabetes, 2 $p < 0,05$ ± Insulin,
3 $p < 0,05$ Glucose 5 mmol/l vs. 11 mmol/l,
4 $p < 0,05$ P 1 vs. P 2

bei höherer Glucosekonzentration im Perfusat (Abb. 6). Im Vergleich zu Kontrollherzen war der basale Lactatausstrom im SZ-Diabetes von Beginn der Perfusion an gesteigert. Zu Beginn der Perfusion wurden etwa 340 - 350 nmol/min. Lactat in das koronare Effluat abgegeben. Weiterhin nahm im Gegensatz zu Kontrollherzen dieser Lactatausstrom während der Perfusionszeit kontinuierlich zu, so daß der Lactatausstrom am Ende der Perfusionszeit im SZ-diabetischen Herzen 3,4 (11 mmol/l Glucose) bis 4,7-fach (5 mmol/l Glucose) gegenüber den Kontrollherzen erhöht war. Im Diabetes wurde somit kein steady state hinsichtlich des Lactatausstromes erreicht. Sowohl die Erhöhung der Glucosekonzentration im Perfusat von 5 auf 11 mmol/l als auch Insulin (5 U/l) führten zur Beschleunigung der Lactatbildung bei Herzen SZ-diabetischer Ratten (Abb. 6). Allerdings war das Ausmaß der Stimulierung durch Insulin sowie das erreichte Maximum im SZ-Diabetes deutlich geringer.

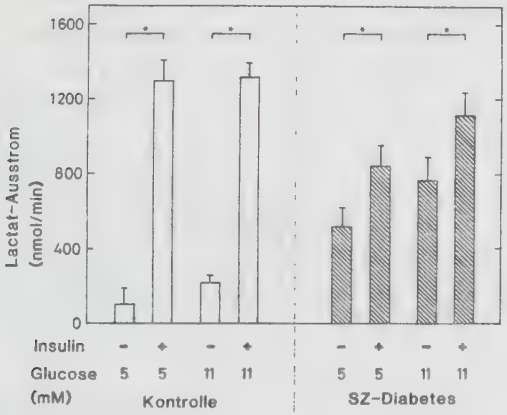


Abb. 6: Einfluß von Insulin und der Glucosekonzentration auf die Lactatabgabe durch das isoliert-perfundierte Herz von Kontroll- und SZ-diabetischen Ratten (nmol/min x g FG). $\bar{x} \pm$ SEM aus P 2, Insulin 5 U/l, * $p < 0{,}05$

Pyruvat:

Kontrollherzen setzten zu Beginn der Perfusion nach der 15-minütigen Äquilibrierungsphase wider Erwarten Pyruvat frei (130 - 140 nmol/min). Mit zunehmender Perfusionsdauer nahm der Pyruvatausstrom jedoch ab. Insulin erhöhte die Menge an freigesetztem Pyruvat 3-fach. Das Lactat/Pyruvat-Verhältnis betrug bei 11 mmol/l Substratglucose zu Beginn der Perfusion (P 1) 1,4 (mit Insulin 2,9) und stieg auf Grund des fallenden Pyruvat-Effluxes auf 7,4 (mit Insulin 5,1) an (Tab. 18, Abb. 7). Zu Beginn der Perfusion setzten SZ-diabetische Rattenherzen Pyruvat mit ähnlicher Geschwindigkeit in das koronare Effluat frei wie Kontrollherzen (11 mmol/l Glucose). Im Gegensatz zu Kontrollherzen nahm der Pyruvat-Efflux aber im Diabetes kontinuierlich in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration auf das 7,5 - 9,5-fache zu. Im Gegensatz zu Kontrollen nahm somit das Lactat/Pyruvat-Verhältnis im Verlauf der Perfusion von 2,2 (mit Insulin 3,25) auf 1,33 (mit Insulin 1,34) ab. Insulin hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Geschwindigkeit der Pyruvatproduktion.

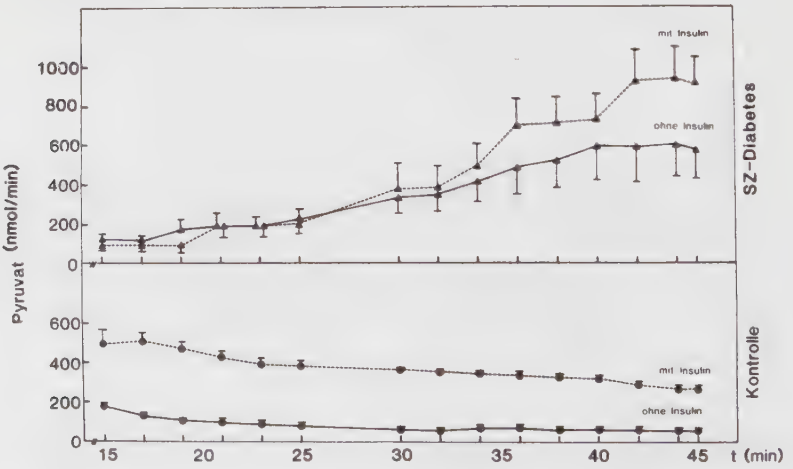


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der Pyruvatproduktion durch das isoliert-perfundierte Herz von Kontroll- und SZ-diabetischen Ratten (nmol/l, Insulin 5 U/l).
$\bar{x} \pm$ SEM, Glucose 11 mmol/l

Gruppe	Glucose	Insulin	Periode 1	(n)	Periode 2	(n)
Kontrolle	5 mM	-	129 ± 34	(4)	78 ± 18	(4)
Diabetes	5 mM	-	276 ± 113	(5)	737 ± 212	(5) [1 4]
Diabetes	5 mM	+	420 ± 129	(6)	856 ± 181	(6) [1 4]
Kontrolle	11 mM	-	143 ± 22	(22)	77 ± 8	(22)
Kontrolle	11 mM	+	377 ± 29	(12) [2]	257 ± 17	(12) [2 4]
Diabetes	11 mM	-	152 ± 42	(20)	577 ± 141	(20) [1]
Diabetes	11 mM	+	156 ± 37	(12)	831 ± 149	(13) [1]

Tab. 18: Einfluß von SZ-Diabetes, Glucosekonzentration und Insulin auf die Pyruvatproduktion durch das isoliert-perfundierte Rattenherz (nmol/min x g FG).
$\bar{x}$ ± SEM, Insulin 5 U/l, 1 $p < 0{,}05$ Kontrolle vs. Diabetes 2 $p < 0{,}05$ ± Insulin, 4 $p < 0{,}05$ P 1 vs. P 2

Die Summe aus Lactat- und Pyruvatproduktion betrug im SZ-diabetischen Herzen 1347 nmol/min und war damit 4,45-fach gegenüber der Pyruvat- und Lactatproduktion von Kontrollherzen gesteigert. Mit Insulin stieg die Geschwindigkeit der Bildung von Lactat und Pyruvat in Kontrollherzen auf 1547 nmol/min und in SZ-diabetischen Herzen auf 1947 nmol/min an (nicht signifikant verschieden).
Der im Vergleich zu Kontrollherzen hohe Lactat- und Pyruvatausstrom deutet darauf hin, daß die geringe Glucoseoxidation im SZ-diabetischen Herzen nicht, oder zumindest nur teilweise, auf eine inhibierte Glycolyse und Glucoseaufnahme durch das Herz zurückzuführen ist, sondern eher Ausdruck der inhibierten Pyruvatoxidation ist.

Intrakardiale Metabolite:

Die Beobachtung, daß die Pyruvatoxidation in diabetischen Herzen für die Glucoseoxidation limitierend ist, nicht aber die Glucoseaufnahme und Glycolyse, sollte sich auch in den Veränderungen des Gehaltes der

intrakardialen Metabolite widerspiegeln.
Tab. 19 gibt deshalb die Konzentrationen einiger Metabolite des Glucosestoffwechsels in gefriergestoppten Herzen wieder. In Abb. 8 sind die relativen Änderungen in den Konzentrationen dieser Metabolite bezogen auf den Gehalt in Kontrollherzen dargestellt.

1. Einfluß der Perfusion

Im Vergleich zu nicht-perfundierten Herzen waren die stationären Konzentrationen einiger Metabolite durch die Perfusion mit glucosehaltigem Perfusionsmedium deutlich vermindert.
Glucose-6-P fiel in Kontrollen auf 15 %, im SZ-Diabetes auf 24 %, Lactat auf 40 % bzw. 19 %, Citrat auf 8 % bzw. 29 % der Bezugswerte in nicht-perfundierten Herzen ab. Wichtig erscheinen insbesondere die Änderungen des Glucose-6-P/Fructose-1,6-bisphosphat-Quotienten, der sich in Kontrollherzen von 16,2 auf 1,82 (bzw. mit Insulin 2,78), im SZ-Diabetes sogar von 87,5 auf 6,9 (bzw. 7,2 mit Insulin) verminderte und damit im perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten niedriger als in nicht-perfundierten Kontrollherzen lag.
Das Lactat/Pyruvat-Verhältnis wurde durch Perfusion in Kontrollherzen wenig beeinflußt, fiel aber in SZ-diabetischen Herzen durch die Perfusion von 55,9 auf 4,5 (bzw. 4,2 mit Insulin) ab.
Aus dem myokardialen Gehalt an Pyruvat und Lactat kann unter der Annahme einer Gleichgewichtskonstanten von K_{LDH} = 1,1 x 10-11 mol/l (Williams et al. 1967) und einem pH = 7,0 ein NAD/NADH-Verhältnis von 715 bei Kontrollen und von 4008 für diabetische Herzen errechnet werden. Perfusion mit Glucose und Insulin führte in beiden Gruppen von Herzen zur Reduktion des NAD/NADH-Quotienten zu 633 bzw. 2202.

Unter der Annahme, daß der Wasseranteil im gefriergestoppten Herzen zu 43 % den extrazellulären Anteil und zu 57 % Gewebswasser darstellt (Bücher et al., 1972), lassen sich folgende intrazelluläre Metabolit-Konzentrationen für Glucose-6-P und Citrat berechnen:

a) Glucose-6-P (mmol/l)	Kontrolle	SZ-Diabetes
nicht perfundiert	0,78	2,45
perfundiert:		
- Insulin	0,11	0,58
+ Insulin	0,55	0,55

b) Citrat (mmol/l)		
nicht perfundiert	1,61	2,27
perfundiert:		
- Insulin	0,12	0,68
+ Insulin	0,62	0,70

Durch Perfusion SZ-diabetischer Herzen mit Glucose und Insulin wurde offensichtlich der Glucose-6-P-Anstau abgebaut, ein Hinweis darauf, daß die Inhibition der Phosphofructokinase (PFK) zumindestens teilweise durch Perfusion mit Glucose reversibel ist. Die myokardiale Citratkonzentration sank im diabetischen Herzen auf Werte ab, wie sie auch in Kontrollherzen bei Perfusion mit Insulin beobachtet wurden und die zur Hemmung der PFK nicht ausreichen dürften. Wird die ausgeprägte Kompartimentierung des myokardialen Citrates berücksichtigt (Kauppinen et al., 1982), so ist davon auszugehen, daß die cytosolische Konzentration an Citrat, die maßgebend für die Regelung der PFK ist, unter 0,1 mmol/l liegt.

2. Vergleich der Metabolite in perfundierten Herzen SZ-diabetischer und nicht-diabetischer Ratten

- Der Gehalt diabetischer Herzen an Lactat, Pyruvat, Glucose-6-P und Citrat war gegenüber Kontrollherzen erhöht.
- Insulin bedingte in nicht-diabetischen Herzen einen Anstieg von Glucose-6-P, α-Glycerin-P, Lactat und Citrat, im SZ-diabetischen

Herzen stieg lediglich die Lactatkonzentration im Herzen an. Während unter diesen Bedingungen (+ Insulin) Glucose-6-P, Lactat und Citrat in Kontroll- und SZ-diabetischen Herzen nicht mehr signifikant voneinander verschieden waren, blieb Pyruvat im SZ-diabetischen Herzen im Vergleich zur Kontrolle weiterhin erhöht; FDP und DHAP wiesen deutlich niedrigere Werte auf.

- Das Glucose-6-P/FDP-Verhältnis wurde durch Insulin in Kontrollen von 1,8 auf 2,8 erhöht. In SZ-diabetischen Herzen hatte Insulin keinen Einfluß auf diesen Parameter.
- Das Verhältnis α-Glycerin-P/Dihydroxyaceton-P unterschied sich in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen nicht signifikant und wurde durch Insulin nicht beeinflußt.
- Das Lactat/Pyruvat-Verhältnis, das in Kontrollherzen bei 11 - 14 lag, war in diabetischen Herzen auf 4 reduziert.

Insulin beeinflußte somit den myokardialen Gehalt der untersuchten Metabolite mit Ausnahme von Lactat in SZ-diabetischen Herzen im Gegensatz zu Kontrollen nicht. Der Glucose-6-P-Gehalt weist daraufhin, daß die PFK-Reaktion in Kontrollherzen mit Insulin, in SZ-diabetischen Herzen unabhängig von Insulin geschwindigkeitsbestimmend für die Glycolyse bleibt. Der Pyruvatgehalt deutet auf einen crossover Punkt in SZ-diabetischen Herzen auf der Ebene der Pyruvatdehydrogenase hin. Diese Befunde stehen in Einklang mit den bereits dargelegten Ergebnissen der Durchsatzmessungen (Glucoseoxidation, Lactat- und Pyruvatabgabe).

3. Glycogen

Bei Perfusion von Kontrollherzen mit Glucose wurde der myokardiale Gehalt von Glycogen nur wenig im Vergleich zu nicht-perfundierten Herzen verändert (Tab. 20). SZ-diabetische Herzen wiesen auch nach Perfusion einen erhöhten Glycogengehalt im Vergleich zu Kontrollen auf.

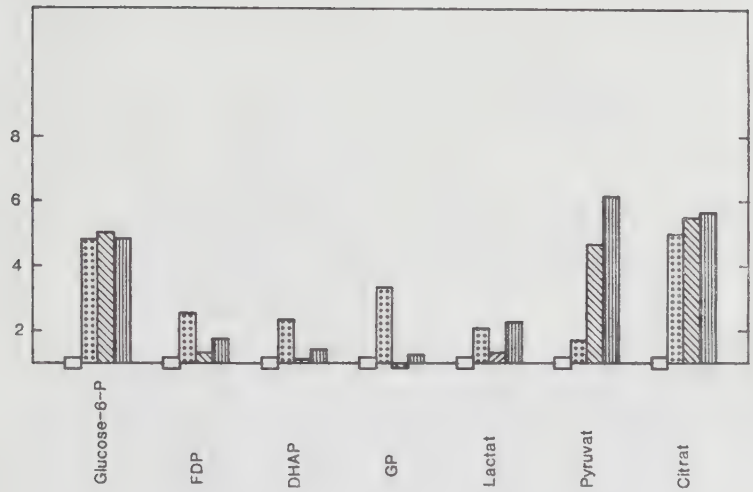


Abb. 8: Metabolite in perfundierten Herzen von Kontroll- und SZ-diabetischen Ratten.
Glucose 11 mmol/l, Insulin 5 U/l, angegeben sind die relativen Konzentrationen bezogen auf die Kontrollherzen perfundiert ohne Insulin (vgl. Tab. 19).

Kontrolle
Kontrolle + Insulin
SZ-Diabetes
SZ-Diabetes + Insulin

Im Vergleich zu nicht-perfundierten SZ-diabetischen Herzen wurde lediglich bei niedriger Substratglucosekonzentration ein Verlust (-25 %) beobachtet.

	Kontrolle		Diabetes	
	ohne Insulin	mit Insulin	ohne Insulin	mit Insulin
Glucose-6-P	53 ± 3 (16)	255 ± 12 (12)[2]	265 ± 34 (20)[1]	258 ± 22 (13)[2]
FDP	32 ± 3 (16)	98 ± 9 (12)[2]	43 ± 3 (11)	57 ± 7 (11)[1,2]
DHAP	17 ± 1 (16)	40 ± 2 (12)[2]	19 ± 1 (11)	24 ± 2 (13)[1]
α-GP	68 ± 10 (16)	228 ± 41 (12)[2]	60 ± 4 (11)	88 ± 11 (12)[1]
Lactat	264 ± 24 (16)	546 ± 47 (12)[2]	352 ± 31 (11)[1]	604 ± 63 (13)[2]
Pyruvat	28 ± 2 (16)	48 ± 5 (12)[2]	131 ± 22 (19)[1]	173 ± 23 (4)[1]
Citrat	57 ± 6 (16)	285 ± 15 (12)[2]	314 ± 58 (20)[1]	324 ± 48 (11)
G-6-P/FDP	1,82 ± 0,15 (16)	2,78 ± 0,23 (12)[2]	6,87 ± 0,95 (20)[1]	7,24 ± 2,09 (11)[1]
α-GP/DHAP	4,31 ± 0,77 (16)	5,97 ± 1,05 (12)	3,16 ± 0,21 (19)	4,89 ± 0,92 (12)
L/P	10,8 ± 1,47 (16)	13,91 ± 1,86 (12)	4,54 ± 0,74 (20)[1]	4,20 ± 0,5 (13)[1]

Tab. 19: Einfluß von SZ-Diabetes und Insulin auf den myokardialen Gehalt ausgewählter Metabolite im perfundierten Rattenherzen (nmol/g FG).

$\bar{x}$ ± SEM, Glucose 11 mmol/l, Insulin 5 U/l,
1 $p < 0,05$ Kontrolle vs. Diabetes, 2 $p < 0,05$ ± Insulin.

Gruppe	Glucose	ohne Insulin	mit Insulin
Kontrolle	5 mM	18,9 ± 1,2 (20)	31,3 ± 1,8 (18) [2]
Diabetes	5 mM	35,6 ± 4,1 (12) [1]	35,7 ± 2,1 (11)
Kontrolle	11 mM	16,7 ± 1,6 (6)	27,3 ± 1,2 (12) [2]
Diabetes	11 mM	42,3 ± 1,8 (20) [1]	49,5 ± 3,1 (13) [1]

Tab. 20: Myokardialer Glycogengehalt nach 45-minütiger Perfusion (µmol/g FG).

$\bar{x}$ ± SEM, Glucose 11 mmol/l, Insulin 5 U/l

1 $p < 0,05$ Diabetes vs. Kontrolle, 2 $p < 0,05$ ± Insulin

In Abwesenheit von Insulin war der Einbau von radioaktiver Glucose in die myokardiale Glycogenfraktion in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen nicht signifikant verschieden. Insulin steigerte den Einbau von Glucose in die Glycogenfraktion in Kontrollherzen 12-fach, hatte aber nur einen geringen, wenn auch signifikanten Einfluß auf die Glycogensynthese des SZ-diabetischen Herzmuskel (Abb. 9).

Auch die Glycogensynthase weist somit im SZ-Diabetes eine verminderte Insulinsensitivität auf. Der erhöhte Glycogengehalt im nicht-perfundierten Herzen kann durch die Aktivität der Glucose-6-P-abhängigen Glycogensynthase D erklärt werden, da im nicht-perfundierten Herzen die myokardiale Glucose-6-P-Konzentration im Bereich der K_i liegt (Rossel-Perez et al., 1962).

a)

b)

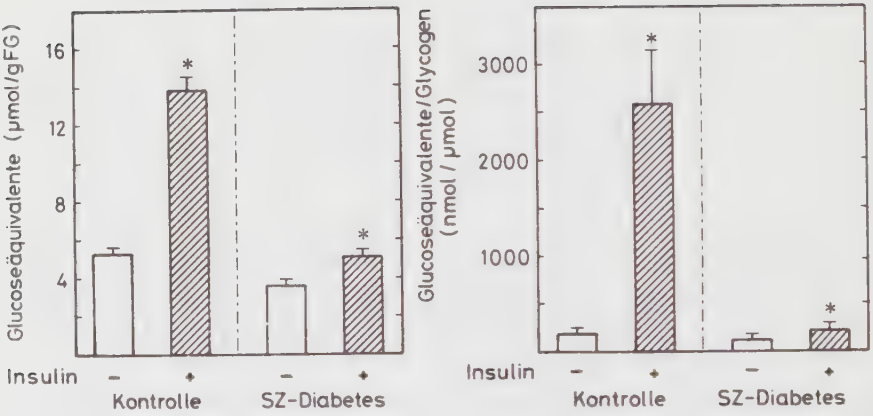


Abb. 9: Einfluß von Insulin und SZ-Diabetes auf die myokardiale Glycogensynthese in isoliert-perfundierten Herzen. Die Glycogensynthese wurde aus der Radioaktivität des myokardialen Glycogens sowie der spezifischen Aktivität der exogenen Glucose berechnet.
a) bezogen auf g FG b) bezogen auf µmol Glycogen/g FG

$\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0{,}05$

(c) Myokardiale Lipolyse im SZ-Diabetes

Als endogene Substrate stehen dem SZ-diabetischen Herzen neben Glycogen Triglyceride in vermehrter Form zur Energiegewinnung zur Verfügung .

Zur Messung der Lipolyse endogener Triglyceride kann im Herzmuskel die Glycerinfreisetzung verwendet werden, da die Reveresterung des Glycerins auf Grund der geringen Glycerinkinaseaktivität (Robinson u. Newsholme, 1967, Wieland u. Syster, 1957) ausgeschlossen werden kann und keine Akkumulation von Mono- und Diglyceriden beobachtet wurde (Denton u. Randle, 1967). Weiterhin ist die Utilisation von Glycerin durch den Herzmuskel vernachlässigbar klein (Rösen et al., 1981). Daraus folgt, daß die Hydrolyse von Glyceriden - falls begonnen - zur vollständigen Spaltung zu Glycerin und Fettsäuren führt.

Kontrollherzen setzten während der 45-minütigen Perfusion nur geringe Mengen an Glycerin frei (Tab. 21), wobei das Ausmaß der Glycerinfreisetzung nicht von der Glucosekonzentration im Perfusionsmedium abhängig war. In Abwesenheit von Insulin nahm der Glycerinausstrom mit zunehmender Perfusionszeit ab.

Im diabetischen Herzen wurden zu Beginn der Perfusion zwischen 40 - 60 nmol Glycerin/min. in das kardiale Effluat abgegeben, d.h. die Lipolyse war im Vergleich zu Kontrollen je nach Versuchsbedingungen 10 - 20-fach beschleunigt. Im Verlauf der Perfusion verlangsamte sich auch bei SZ-diabetischen Herzen die Lipolysegeschwindigkeit (Tab. 21).

Insulin (5 U/l) führte in allen Perfusionsversuchen - sowohl bei Kontroll- als auch SZ-diabetischen Herzen - zur Beschleunigung des Glycerinausstromes und damit der Lipolyse endogener Triglyceride.

Triglyceride leisten somit einen beachtlichen Beitrag für die

myokardiale Energiegewinnung nur im SZ-diabetischen Herzen.

Gruppe	Glucose	Insulin	Periode 1 (n)	Periode 2 (n)
Kontrolle	5 mM	-	5,7 ± 1,3 (10)	2,3 ± 0,5 (13) [4]
Kontrolle	5 mM	+	11,6 ± 2,0 (9)	7,8 ± 0,8 (11)
Diabetes	5 mM	-	55,7 ± 6,6 (9) [1]	49,5 ± 4,9 (9) [1]
Diabetes	5 mM	+	47,3 ± 8,8 (8) [1]	55,0 ± 8,6 (8) [1]
Kontrolle	11 mM	-	4,2 ± 0,7 (21)	1,8 ± 0,5 (21)
Kontrolle	11 mM	+	5,9 ± 0,9 (12)	7,2 ± 1,3 (12)
Diabetes	11 mM	-	47,8 ± 3,6 (19) [1]	36,4 ± 3,2 (19) [3,4]
Diabetes	11 mM	+	68,4 ± 4,4 (13) [1]	49,4 ± 3,0 (13) [4]

Tab. 21: Einfluß von SZ-Diabetes, Glucosekonzentration und Insulin auf die Glycerinabgabe durch das isoliert-perfundierte Herz (nmol/min x g FG).

$\bar{x}$ ± SEM 1 $p < 0,05$ Kontrolle vs. Diabetes
3 $p < 0,05$ Glucose 11 mmol/l vs. 5 mmol/l
4 $p < 0,05$ P 1 vs. P 2

(d) Berechnung der Umsatzraten von Glucose (Glycolyse und Pyruvatoxidation) und Sauerstoffbilanz im SZ-diabetischen Rattenherzen.

Die im Vergleich zu Kontrollen im SZ-Diabetes erhöhte Abgabe von Pyruvat und Lactat in das koronare Effluat deutete bereits darauf-hin, daß die verminderte Pyruvatoxidation nicht Ausdruck eines reduzierten glycolytischen Umsatzes ist.

Die Berechnung des Glycolyseflusses setzt voraus, daß die totale Produktion von Lactat oder Pyruvat (das in das kardiale Effluat abgegebene und das durch die PDH decarboxylierte Pyruvat) sowie der Anteil des Pyruvates bestimmt wird, der aus dem Glycogen stammt. Unter der Annahme, daß die Pyruvatbildung aus Alanin im Herzen vernachlässigbar klein ist (Mowbray u. Ottaway, 1973), ergibt sich der aus dem Glycogen stammende Anteil an Pyruvat aus der spezifischen Radioaktivität des Pyruvates im koronaren Effluat im Vergleich zu der Aktivität der im Perfusat eingestzten Glucose (Isotopenverdünnung). Aus der Untersuchung der Zeitabhängigkeit der spezifischen Radioaktivität des in das kardiale Effluat abgegebenen Pyruvates folgte, daß nach 30-minütiger Perfusion die spezifische Aktivität des Pyruvates einen konstanten Wert erreichte. Dies legt den Schluß nahe, daß sich zu diesem Zeitpunkt ein konstantes Fließgleichgewicht zwischen exogener Perfusat-Glucose und dem aus dem Glycogen stammenden Glucoseanteil eingestellt hat.
Für die Berechnung des Glycolyseflusses, der Pyruvatoxidation sowie der Sauerstoffbilanz wurden deshalb Mittelwerte aus 5 Einzelmessungen zwischen der 36. und 45. Perfusionsminute zugrundegelegt. Bei einer Glucosekonzentration im Perfusat von 11 mmol/l ergaben sich folgende Daten (Tab. 22):

- In nicht-diabetischen Rattenherzen entstammen etwa 2/3 des Pyruvates aus exogener Glucose, 1/3 aus Glycogen. In Gegenwart von Insulin wurde die Produktion und Oxidation von Pyruvat aus Glycogen-Glucose zurückgedrängt, so daß unter diesen Bedingungen nahezu ausschließlich Perfusat-Glucose metabolisiert wurde.

- Im SZ-diabetischen Herzen war der Anteil an exogener Glucose am Glucoseumsatz im Vergleich zur Kontrolle vermindert (57 %). Weiterhin hatte Insulin im Gegensatz zum Kontrollherzen keinen signifikanten Einfluß auf das Verhältnis von Perfusat- zu Glycogen-Glucose.

- Die Lactat- und Pyruvat-Produktion im koronaren Effluat betrug in Kontrollherzen 300 nmol/min. und stieg durch Insulin auf das 5-fache des Ausgangswertes an. SZ-diabetische Rattenherzen wiesen im Gegensatz zur Kontrolle bereits ohne Insulin eine C3-Körper-Produktion von 1347 nmol/min. auf, d.h. die Lactat- und Pyruvatproduktion war im SZ-Diabetes 4,5-fach gegenüber der Kontrolle gesteigert und damit nicht signifikant von dem Wert verschieden, den Kontrollherzen mit Insulin erreichten. Auch im SZ-diabetischen Herzen bedingte Insulin lediglich eine geringe Steigerung der Lactat- und Pyruvatabgabe in das koronare Effluat.

- Der Glycolysedurchsatz (Lactat und Pyruvat im venösen Efflux und durch die PDH oxidiertes Pyruvat) betrug in Kontrollen 651 nmol/min. und stieg mit Insulin auf das 2,2-fache an. Das SZ-diabetische Herz wies demgegenüber einen Glycolysefluß von 763 nmol/min. auf, d.h. im Diabetes war die Glycolyse gegenüber Kontrollen leicht beschleunigt. Mit Insulin stieg der Glycolysefluß in Kontrollherzen auf 1413 nmol/min. an, während SZ-diabetische Herzen nur 76 % dieses Kontrollwertes erreichten.

- In Kontrollherzen wurde 77 % des in der Glycolyse gebildeten Pyruvates durch die PDH umgesetzt und in den Citrat-Zyklus eingeschleust. Insulin beschleunigte die Pyruvatoxidation um 25 %,

steigerte den Lactat- und Pyruvatausstrom aber auf das 5,2-fache des Ausgangswertes, so daß die unter Insulin vermehrt aufgenommene Glucose zum überwiegenden Teil nicht zu CO_2 oxidiert, sondern zu Lactat und Pyruvat metabolisiert wurde. Im SZ-diabetischen Herzen sank der Anteil des Pyruvates, der zu CO_2 oxidiert wurde, auf etwa 10 % der insgesamt durch die Glycolysekette gebildeten C3-Säuren ab.

- Unter der Annahme, daß die maximale PDH-Aktivität (PDH_{a+b}) in Herzen von Kontroll- und SZ-diabetischen Ratten maximal 5000 nmol/min x g FG beträgt und im perfundierten Herzen nur die PDH_a metabolisch aktiv ist, ergibt sich, daß in Kontrollherzen 20 % der gesamten PDH-Aktivität in der aktiven Form (PDH_a) vorliegt. Im SZ-Diabetes fiel der Anteil der PDH_a an der gesamten PDH-Aktivität auf 4 % ab.

	Kontrolle		Diabetes	
Insulin	-	+	-	+
Lactat + Pyruvat (nmol/min)	303 ± 43	1574 ± 93 [2]	1347 ± 261 [1]	1947 ± 174 [1]
$\frac{^{14}C\text{-Pyruvat}}{\text{Pyruvat total}}$ X 100	68 ± 14	98 ± 1 [2]	57 ± 8	68 ± 13
Pyruvatoxidation (nmol C3/min)	997 ± 84	1251 ± 49 [2]	178 ± 25 [1]	201 ± 18 [1]
Glycolyse (nmol C6/min)	651 ± 128	1413 ± 110 [2]	763 ± 212	1073 ± 166 [1]
Glucoseoxidation (%)	77	44	12	11
PDH_a/Gesamtaktivität (%)	20	25	4	4

Tab. 22: Lactat- und Pyruvatproduktion sowie Glycolyse im isoliert-perfundierten Herzen von Kontroll- und SZ-diabetischen Ratten. Lactat und Pyruvat wurden im kardialen Effluat bestimmt; der Anteil an Pyruvat, gebildet aus exogener Glucose am Gesamtpyruvat, wurde aus der spezifischen Aktivität des Pyruvates berechnet. Glycolyse (nmol Glucoseäquivalente/min):

Fortsetzung der Legende zu Tab. 22:

$$\frac{\text{Lactat + Pyruvat}}{2} + \text{Glucoseoxidation}$$

$$\text{Glucoseoxidation (\%)}: \frac{\text{Pyruvatoxidation}/2}{\text{Glycolyse}} \times 100$$

$$\text{PDH-Aktivität (\%)}: \frac{\text{Pyruvatoxidation}}{\text{PDH}_{a+b}\ \text{(enzymat.)}} \times 100$$

1 $p < 0{,}05$ Diabetes vs. Kontrolle, 2 $p < 0{,}05$ $\pm$ Insulin

Für die Berechnung der myokardialen Sauerstoffbilanz wurde vorausgesetzt:

a) Durch hydrolytische Spaltung gebildete Fettsäuren akkumulieren im Herzen nicht, sondern werden in erster Linie oxidiert. Diese Annahme gründet sich auf die Beobachtung, daß auch unter Bedingungen einer beschleunigten Lipolyse wie im SZ-Diabetes in der Freien-Fettsäure-Fraktion weniger als 1 % der Fettsäureacylreste enthalten sind und sich der Betrag an freien Fettsäuren im SZ-Diabetes lediglich um 25 % erhöht, während die Lipolyse 10 - 20-fach im Vergleich zur Kontrolle beschleunigt ist (Bildung von 50 nmol/min. Glycerin entspricht bei vollständiger Hydrolyse 150 nmol/min. Fettsäuren, d.h. durch die Lipolyse werden im SZ-diabetischen Herzen innerhalb von 1 - 1,5 Minuten Fettsäuren in einer Menge gebildet, die der gesamten Freien-Fettsäure-Fraktion entspricht). Acylcarnitin- und -CoA Derivate stellen auf die Lipolysegeschwindigkeit bezogen ebenfalls einen Fettsäure-Pool mit geringer Kapazität dar (<50 nmol/g FG).

b) Mono- und Diglyceride sind im Herzmuskel nur in geringer Menge nachweisbar und akkumulieren unter den Bedingungen einer beschleunigten Lipolyse nicht (Denton u. Randle, 1967). Zudem hydrolysiert die neutrale Triacylglycerin-Hydrolase Triglyceride vollständig (Rösen et al., 1981).
Für die Berechnung der Sauerstoffbilanz wurde deshalb davon ausgegangen, daß 1 nmol Glycerin 3 nmolen oxidierten Fettsäuren ent-

spricht.

c) Für die Oxidation der Fettsäuren wurde ein mittlerer Sauerstoffbedarf von 26,5 nmol/nmol Fettsäure zugrunde gelegt, entsprechend der mittleren Fettsäurezusammensetzung der myokardialen Triglyceride.

d) Auf Grund der niedrigen Aktivität der Glycerinkinase und Vorversuchen mit Glycerin als Substrat im Perfusionsmedium kann zudem ausgeschlossen werden, daß Glycerin in nennenswertem Umfang phosphoryliert wird und damit zur Reveresterung von Fettsäuren dient (Rösen und Reinauer, unpubliziert, Robinson u. Newsholme, 1967, Wielnd u. Syster, 1957).

e) Die Oxidation von Aminosäuren sowie ihre Abgabe in das kardiale Effluat spielten unter den Versuchsbedingungen für die Sauerstoffbilanz keine Rolle wie aus Kontrollversuchen folgte. Die Freisetzung von Aminosäuren in das kardiale Effluat lag unter 1 nmol/min. Auf die minimale Bildung von Alanin wurde bereits hingewiesen (Mowbray u. Ottaway, 1973). In Gegenwart von Insulin können 90 % der gesamten myokardialen Sauerstoffaufnahme von Kontroll- und SZ-diabetischen Herzen durch die Oxidation von Pyruvat und Fettsäuren erklärt werden (Tab. 23)

	O_2-Verbrauch (µmol/min)	
	Kontrolle	Diabetes
Glucoseoxidation	3,76 ± 0,31	0,60 ± 0,11
Fettsäureoxidation	0,57 ± 0,10	3,93 ± 0,24
Summe	4,33	4,53
O_2-Verbrauch exp.	4,73 ± 0,22	5,00 ± 0,21
$\frac{O_2\text{-Verbrauch err.}}{O_2\text{-Verbrauch exp.}}$	91,4 %	90,6 %

Tab. 23: Sauerstoffbilanz. Anteil der Oxidation von Glucose und Fettsäuren am myokardialen Sauerstoffverbrauch in Kontroll- und SZ-diabetischen Herzen.
Glucose 11 mmol/l, Insulin 5 U/l, n = 5 - 7 $\bar{x} \pm$ SEM

Wie aus Tab. 23 folgt, entfallen in Kontrollen 80 % des gesamten Sauerstoffverbrauches auf die Oxidation von Glucose, auf die Fettsäureoxidation lediglich 12 %. Im Gegensatz hierzu stellte in SZ-diabetischen Herzen die Fettsäureoxidation mit 79 % den größten Sauerstoffverbraucher dar, während auf die Oxidation von Glucose lediglich 11 - 12 % entfielen.
Wichtigstes Substrat sind im SZ-diabetischen Herzen die endogenen Triglyceride trotz Perfusion mit Glucose und Insulin.

(e) Einfluß der Arbeitsleistung auf den myokardialen Glucoseumsatz

Da die Bedeutung von Insulin für den myokardialen Glucosestoffwechsel in Zweifel gezogen wurde und lediglich der Arbeitsleistung eine regulative Funktion unter physiologischen Bedingungen zugesprochen wurde (Taegtmeyer et al., 1980, aber gegensätzlich Sudgen u. Smith, 1982), wurde die Arbeitsleistung des perfundierten Herzens variiert, um zu prüfen, ob unter gesteigerter Arbeitsleistung eine Normalisierung der Glucoseoxidation im SZ-diabetischen Rattenherzen möglich ist.

Bei niedriger Arbeit (LW) betrug der kardiale Inflow 15 ml/min.; aus dem durchschnittlichen kardialen Output und dem linksventrikulären maximalen Druck PLV von 60 mm Hg kann nach Müller-Ruchholtz u. Lochner (1971) eine Arbeitsleistung von LW = 12,3 g x m/min x g FG berechnet werden. Eine hohe Arbeitsleistung (HW) wurde durch Variation des Inflows auf 25 ml/min. und des linksventrikulären maximalen Druckes PLV auf 95 mm Hg - HW = 34,4 g x m/min x g FG - erreicht, was einer Erhöhung der zu leistenden Arbeit auf das 3,5-fache des Ausgangswertes bedeutet.

Erhöhung der kardialen Arbeit ging parallel mit einer leichten Beschleunigung der Schlagfrequenz des Herzens, mit einem Anstieg von dp/dt_{max}, des koronaren Flusses sowie des Sauerstoffverbrauches (Tab. 24).

Unter LW waren der koronare Fluß und dp/dt im diabetischen Herzen im Vergleich zur Kontrolle erhöht, HW bedingte aber mit Ausnahme des koronaren Flusses keinen signifikanten Unterschied in der Druckentwicklung, im Sauerstoffverbrauch und der Herzfrequenz.

		Kontrolle (n)	%	Diabetes (n)	%
Herzfrequenz (Schläge/min)	LW	244 ± 14 (8)	+14 ± 11	244 ± 17 (4)	+9 ± 7
	HW	277 ± 8 (17)		265 ± 7 (10)	
dp/dt (mm Hg/sec)	LW	1141 ± 68 (8)	+65 ± 22*	1312 ± 104 (4)	+39 ± 10*
	HW	1883 ± 179 (17)		1825 ± 75 (10)	
Koronar.Fluß (ml/min)	LW	8,6 ± 0,65 (8)	+74 ± 16*	10,4 ± 0,3 (4)	+80 ± 12*
	HW	15,0 ± 0,7 (17)		18,0 ± 0,9 (10)	
O_2-Aufnahme (µl/min)	LW	93,6 ± 8,3 (8)	+82 ± 8 *	108 ± 7,5 (4)	+68 ± 11*
	HW	170 ± 7,0 (17)		181 ± 10 (10)	

Tab. 24: Einfluß der Erhöhung der Arbeitsleistung des isoliert-perfundierten Herzens auf die Funktion des Herzens. LW = geringe Arbeitsleistung, HW = hohe Arbeitsleistung Glucose 5 mmol/l,
$\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0,05$

Die Vergrößerung der zu leistenden Arbeit führte in Kontrollherzen zur Beschleunigung der Glucoseoxidation ($f = 2,9$), hatte aber im SZ-Diabetes keinen Einfluß auf diesen Parameter. Die für das Langendorff-Modell bereits beschriebene Inhibition der PDH bleibt demnach auch unter HW-Bedingungen und bei erhöhtem Sauerstoffverbrauch bestehen. Dementsprechend stieg der Anteil des Sauerstoffes, der auf die Oxidation exogener Glucose entfiel, in Kontrollherzen zwar von 49 auf 79 % und HW an; Arbeit hatte aber keinen signifikanten Einfluß auf den auf die Glucoseoxidation entfallenden Anteil am Sauerstoffverbrauch im SZ-diabetischen Herzen (Tab. 25).

		Kontrolle (n)	Diabetes (n)
Glucoseoxidation (nmol Gluc./min)	LW	411 ± 27 (3)	43,8 ± 10 (3)
	HW	891 ± 51 (3) *	54,0 ± 10 (5)
max.Glucoseoxidation (nmol Gluc./min)	LW	693 ± 35 (3)	620 ± 56 (3)
	HW	1256 ± 35 (3) *	1131 ± 114 (3) *
% O_2 für die Oxidation exogener Glucose	LW	59,8 ± 6,2 (3)	4,6 ± 1,3 (3)
	HW	85,0 ± 1,5 (3) *	3,6 ± 1,1 (5)

Tab. 25: Einfluß von Arbeitsleistung auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch und die Glucoseoxidation.
LW = niedrige Arbeit, HW = hohe Arbeit
Glucose 5 mmol/l
$\bar{x}$ ± SEM, * $p < 0,05$

Die Erhöhung der Arbeit hatte im Gegensatz zur Wirkung von Insulin weder in Kontroll- noch in SZ-diabetischen Herzen Einfluß auf die kardiale Lactatproduktion noch auf den myokardialen Glycogen- und Lactatgehalt und beeinflußte auch das Verhältnis ATP/ADP, CP/C sowie den energy charge nicht.

Zusammenfassung:
Einfluß von SZ-Diabetes auf die mechanischen und biochemischen Eigenschaftes des isoliert-perfundierten Rattenherzens.

(1) Funktion: Herzfrequenz und Sauerstoffverbrauch unterschieden sich in isoliert-perfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten nicht. dp/dt_{max} war zu Beginn der Perfusion im SZ-Diabetes erniedrigt, nahm aber im Verlauf der Perfusion auf Kontrollwerte zu. Der koronare Fluß war SZ-diabetischen Herzen erhöht.

(2) Energiereiche Phosphate: SZ-diabetische Herzen weisen im Vergleich zu Kontrollen einen Verlust an ATP und anderen Adeninnucleotiden auf. Das ATP/ADP-Verhältnis war im SZ-Diabetes deutlich verringert. Im Gegensatz zu Kontrollherzen hatte Insulin im Diabetes keinen Einfluß auf den ATP- und CP-Gehalt. Der myokardiale Gehalt an CP sowie der Quotient CP/C waren im SZ-Diabetes im Vergleich zu Kontrollen erhöht.

(3) Glucoseoxidation: Die Glucoseoxidation war im SZ-Diabetes inhibiert. Lediglich 4 - 8 % des Sauerstoffverbrauches wurde für die Oxidation von Glucose im Diabetes aufgewendet. Während in Kontrollherzen mit Insulin nahezu ausschließlich exogene Glucose umgesetzt wurde, hatte Insulin im SZ-Diabetes keinen Einfluß auf die Glucoseoxidation.

(4) Lactatproduktion: In Kontrollherzen erreichte die Lactatproduktion einen steady state und war von der Glucosekonzentration im Perfusat abhängig. Insulin beschleunigte die Lacatproduktion auf das 10 - 12-fache des Ausgangswertes. Im SZ-Diabetes erfolgte eine stetige Zunahme der im Vergleich zu Kontrollen erhöhten Lactatfreisetzung. Insulin hatte nur einen geringen Einfluß auf die Lactatproduktion im SZ-diabetischen Rattenherzen.

(5) Pyruvatbildung: Pyruvat wurde von Kontrollen nur in geringer Konzentration in das Perfusat abgegeben und fiel im Verlauf der Per-

fusionszeit weiter ab. Die Pyruvatfreisetzung war sowohl von der Glucosekonzentration im Perfusat als auch von Insulin abhängig. Im SZ-Diabetes war der Pyruvatausstrom im Vergleich zur Kontrolle erhöht und stieg im Verlauf der Perfusionszeit wie die Lactatfreisetzung stetig an. Insulin hatte im SZ-Diabetes keinen Einfluß auf die Pyruvatbildung.

(6) Die Summe aus Lactat und Pyruvat war im SZ-Diabetes 4,5-fach gegenüber Kontrollen erhöht und damit nicht signifikant von der verschieden, die in Kontrollen mit Insulin erreicht wurde. Insulin bewirkte eine geringe Beschleunigung der Freisetzung von Lactat und Pyruvat.

(7) Metabolite: Der myokardiale Gehalt an G6P, Citrat, α-GP und Pyruvat war im perfundierten Herz SZ-diabetischer Ratten im Vergleich zu Kontrollen erhöht, lag aber deutlich niedriger als in nichtperfundierten Kontrollherzen. Dies wird insbesondere deutlich am G6P/FDP-Verhältnis, das im SZ-Diabetes durch Perfusion von 87 auf 7, in Kontrollen von 16 auf 2 - 3 abfiel.

(8) Das L/P-Verhältnis wurde in Kontrollherzen durch die Perfusion wenig beeinflußt, fiel aber im SZ-Diabetes von 55,9 auf 4 ab. Daraus folgt, daß durch Perfusion mit glucosehaltigem Puffer der Redoxstatus in Kontrollherzen unbeeinflußt blieb (NAD/NADH 715 bzw. 793), im SZ-diabetischen Rattenherzen aber deutlich verändert wurde. Das NAD/NADH-Verhältnis änderte sich hier von 205 auf 4000.

(9) Glycogen: Der myokardiale Gehalt an Glycogen nahm in Kontrollherzen perfundiert in Gegenwart von Insulin zu (Glycogensynthese), im SZ-Diabetes wurde der Glycogengehalt durch Perfusion nicht verändert oder nahm leicht ab (Glycogenolyse). Der Einbau von radioaktiver Glucose in myokardiales Glycogen wurde im SZ-Diabetes wenig durch Insulin beeinflußt.

(10) Lipolyse: Die Lipolyse gemessen am Glycerinausstrom war im SZ-diabetischen Herzen gegenüber der Kontrolle 10 - 20-fach erhöht, nahm aber zeitabhängig im Verlauf der Perfusion ab. Insulin führte in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen zu einem vermehrten Glycerinausstrom, beschleunigte somit die Lipolyse.

(11) Glycolyse: Aus der spezifischen Aktivität des Pyruvates wurde die Glycolyse berechnet. In Kontrollen nahm die Glycolyse durch Insulin von 651 auf 1413 nmol/min. Glucoseäquivalente zu. Im SZ-diabetischen Herzen hatte Insulin keinen signifikanten Einfluß auf die Glycolysegeschwindigkeit, die maximal 76 % des Kontrollwertes (+ Insulin) erreichte.

(12) Pyruvatoxidation: Während in Kontrollherzen 77 bzw. 44 % (mit Insulin) des in der Glycolyse gebildeten Pyruvates zu CO_2 oxidiert wurde, fiel der Anteil des oxidierten Pyruvates im SZ-Diabetes auf 9 - 12 % ab. Daraus errechnet sich, daß im Kontrollherzen zu 20 - 25 %, im SZ-Diabetes hingegen lediglich 4 % der Gesamt-PDH-Aktivität als PDH_a vorliegen.

(13) Sauerstoffbilanz: In Gegenwart von Insulin entfielen in Kontrollherzen 80 % des gesamten Sauerstoffverbrauches auf die Pyruvatoxidation, 12 % auf die Oxidation von Fettsäuren. Im SZ-Diabetes verbrauchte das perfundierte Rattenherz 79 % des aufgenommenen Sauerstoffs für die Oxidation von Fettsäuren. Auf die Pyruvatoxidation entfielen lediglich 10 - 12 % des myokardialen Sauerstoffverbrauches.

Das mit Glucose als einzigem Substrat perfundierte SZ-diabetische Rattenherz zeichnet sich durch eine beschränkte Nutzung von Glucose als Substrat aus. Stattdessen werden für die Energiegewinnung in erster Linie durch Lipolyse aus endogenen Triglyceriden gewonnene Fettsäuren verwendet. Die Oxidation dieser Fettsäuren kann die Hemmung der Pyruvatoxidation auf der Stufe der Pyruvatdehydrogenase sowie den hohen Pyruvat-Efflux erklären. Während die Pyruvatoxidation überwiegend inhibiert bleibt, wird durch Perfusion der Herzen mit Glucose die

in vivo bestehende Hemmung der Glycolyse und der Phosphofructokinase durch Citrat zumindest partiell aufgehoben. Das SZ-diabetische Herz weist eine verminderte Insulinsensitivität im Sinne einer reduzierten Antwort bezüglich der Glucoseaufnahme und des glycolytischen Umsatzes von Glucose auf. Auch die Glycogensynthese weist im SZ-diabetischen Herzen eine verminderte Insulinsensitivität (verminderte Antwort) auf.

C 3. Wechselwirkungen zwischen intrakardialer Lipolyse und Glucosemetabolismus im isoliert perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten

(a) Substratabhängigkeit der Lipolyse und der Einfluß von Insulin

Um die Regulation der myokardialen Lipolyse und ihren Einfluß auf die Glucoseoxidation des Herzens zu charakterisieren, wurde die Abhängigkeit der myokardialen Lipolyse von den endogenen Triglyceridreserven und der Perfusionszeit untersucht sowie geprüft, ob die Erschöpfung der Triglyceridreserven Auswirkungen auf den Glucosestoffwechsel des SZ-diabetischen Herzens im Sinne einer Beschleunigung der Glucoseoxidation hat. Die Lipolysegeschwindigkeit verringerte sich während einer 160-minütigen Perfusionszeit (5 mmol/l Glucose) zunächst, um nach etwa 110 min. einen konstanten Werte zu erreichen (Abb. 10). Nach 160-minütiger Perfusion betrug der Triglyceridgehalt im SZ-diabetischen Herzen noch 1,6 µmol/g FG, d.h. der Nettoumsatz betrug demnach 4,2 µmol/g FG oder 85 % der zu Beginn der Perfusion vorhandenen Triglyceride. Eine vollständige Metabolisierung der myokardialen Triglyceride erfolgte jedoch weder in Kontrollen noch in SZ-diabetischen Herzen.

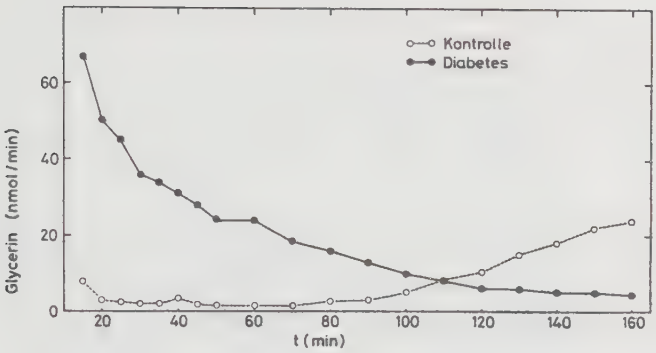


Abb. 10: Zeitabhängigkeit der myokardialen Lipolyse im isoliert-perfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten (nmol/min. x g FG), Glucose 5 mmol/l,

$\bar{x} \pm SEM$

Den Zusammenhang zwischen Glycerinfreisetzung und endogenem Triglyceridgehalt perfundierter Herzen verdeutlicht Abb. 11. Die aktuelle Substratkonzentration wurde hierfür aus dem Triglyceridgehalt nicht-perfundierter Herzen (t = 0 min.) und dem integralen Glycerinausstrom während der Perfusion errechnet. Eine basale Lipolyserate ergab sich bei einer Substratkonzentration von 1 - 2 µmol Triglycerid/g FG. Zunehmender Gehalt an Triglyceriden führte zu einer deutlichen Beschleunigung der Glycerinfreisetzung. Die maximale Lipolysegeschwindigkeit wurde bei einem Triglyceridgehalt von 5 µmol/g FG erreicht, ein Triglyceridgehalt, der typisch für Herzen SZ-diabetischer Ratten ist (C 1).

Da die Kurve eine typische Sättigungscharakteristik zeigt, kann V_{max} aus dem maximalen Glycerinausstrom zu V_{max} = 70 nmol/min. abgeschätzt werden, was einer spezifischen Aktivität von 0,7 nmol Glycerin/min. x mg Protein oder 2,1 nmol Fettsäuren/min x mg Protein entspräche (C 4).

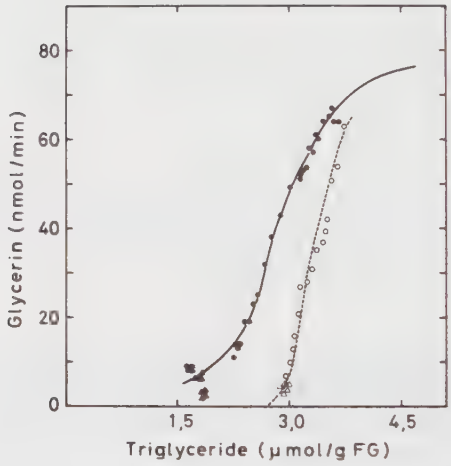


Abb. 11: Abhängigkeit der myokardialen Lipolyse vom Gehalt an Triglyceriden.
Der Triglyceridgehalt wurde aus dem Gehalt zur Zeit t = 0 min. (nicht-perfundierte Herzen) und dem Glycerinausstrom isoliert-perfundierter Herzen errechnet.
Kontrollen (△)
SZ-Diabetes (○)
offene Symbole: mit 5 U/l Insulin
ausgefüllte Symbole: ohne Insulin
Glucose 5 mmol/l

Insulin führte in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen zu einer Beschleunigung der Lipolyse gemessen am Glycerinausstrom (Tab. 21). Wurde die Geschwindigkeit der Glycerinproduktion als Funktion des errechneten Triglyceridgehaltes aufgetragen (Abb. 11), so ergab sich eine Rechtsverschiebung der Substratgeschwindigkeitskurve zu höheren Konzentrationen. Andererseits war aber der Nettoumsatz an myokardialen Triglyceriden mit Insulin geringer (Tab. 26).

Zeit (min)	t = 0 (µmol/g FG)	t = 160 (µmol/g FG)	Differenz (µmol/g FG)
Kontrolle	1,8 ± 0,4	0,86 ± 0,23 **	- 0,94
Kontrolle + Insulin	1,8 ± 0,4	1,27 ± 0,09 **	- 0,53
Diabetes	5,8 ± 0,2 *	1,59 ± 0,21 **	- 4,21
Diabetes + Insulin	5,8 ± 0,2 *	2,38 ± 0,38 **	- 3,42

Tab. 26: Umsatz an myokardialen Triglyceriden bei 160-minüter Perfusion.
Glucose 5 mmol/l, Insulin 5 U/l, $\bar{x} \pm$ SEM
* $p < 0,05$ Kontrolle vs. Diabetes
** $p < 0,05$ Triglycerid (t_0) vs. Triglycerid (t_{160})

Die Rechtsverschiebung der Geschwindigkeits-Substrat-Kurve bei verringertem Nettoumsatz an Triglyceriden, aber beschleunigter Bildung von Glycerin deuten darauf hin, daß durch Insulin die Reveresterung der lipolytisch gebildeten Fettsäuren zu Triglyceriden gefördert wird.

Parallel zur Verlangsamung der Lipolyse erfolgte im SZ-Diabetes eine Beschleunigung der Glucoseoxidation. Bis zur 45. Minute war die Oxidation exogener Glucose im SZ-diabetischen Herzen inhibiert, nahm aber am Ende der Perfusionszeit (160 min.) auf das 8 - 10-fache des Ausgangswertes zu. Nach 160-minütiger Perfusion (5 mmol/l Glucose, 5 U/l Insulin) war die Oxidation von exogener Glucose in SZ-diabetischen Herzen und Kontrollherzen nicht länger signifikant verschieden (Abb. 12). In beiden experimentellen Gruppen entfielen 95 % des gesamten Sauerstoffverbrauchs auf die Oxidation exogener Glucose, so daß sowohl die Oxidation von Fettsäuren als auch von Glycogenglucose eine untergeordnete Rolle im oxidativen Metabolismus innehatten. Im Gegensatz zu Kontrollen (mit Insulin) verringerte sich der Glycogengehalt in SZ-diabetischen Herzen von 47,5 auf 1 - 2 µmol/g FG (2 - 3 % des Ausgangswertes) unabhängig vom Insulin (Tab. 27).

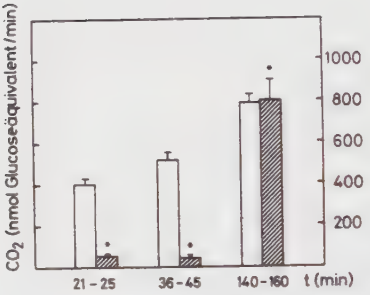


Abb. 12: Oxidation exogener Glucose in Kontrollen und SZ-diabetischen Rattenherzen während 160-minütiger Perfusion. Glucose 5 mmol/l, Insulin 5 U/l, $\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0,05$ Kontrollen: □ Diabetes: ▨

Es sei darauf hingewiesen, daß sich sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch die Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt) in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen während der 160-minütigen Perfusion nicht änderten.

Die beschleunigte Glucoseoxidation ist somit nicht auf eine vermehrte Arbeitsleistung zurückzuführen, sondern weist daraufhin, daß Glucose an Stelle alternativer Substrate wie Fettsäuren oxidiert wurde und die Glucoseoxidation umgekehrt proportional zur Lipolyse anstieg.

Zeit (min)	t = 0 (µmol/g FG)	t = 160 (µmol/g FG)	Differenz (µmol/g FG)
Kontrolle	19,65	2,7 ± 0,7	- 16,95
Kontrolle + Insulin	19,65	27,6 ± 0,6 **	+ 7,95 **
Diabetes	47,5	1,1 ± 0,6	- 46,4 *
Diabetes + Insulin	47,5	1,8 ± 0,5	- 45,7 *

Tab. 27: Veränderung des myokardialen Glycogengehaltes während 160-minütiger Perfusion. Glucose 5 mmol/l, Insulin 5 U/l. * $p < 0,05$ Kontrolle vs. Diabetes, ** $p < 0,05$ ± Insulin $\bar{x} \pm$ SEM

(b) Einfluß von Catecholaminen und Glucagon auf die myokardiale Lipolyse

Außer Insulin sollen im wesentlichen Catecholamine und Glucagon an der hormonellen Regulation der myokardialen Lipolyse beteiligt sein (Challoner u. Steinberg, 1965, Christian et al., 1969, Jesmok et al., 1977, Hülsman u. Stam, 1979, Stam u. Hülsmann, 1981).

Glucagon hatte unter unseren experimentellen Bedingungen bis zu einer Konzentration von 5 x 10^{-8} mol/l keinen Einfluß auf den Glycerinausstrom und damit auf die Lipolysegeschwindigkeit im isoliert-perfundierten Herzen.

Adrenalin (11 nmol/min) beschleunigte den Glycerinausstrom in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen (Abb. 13). Sowohl in Kontrollen als auch in SZ-diabetischen Herzen stieg der Sauerstoffverbrauch jedoch relativ stärker als die Glycerinfreisetzung an, d.h. der Anteil des auf die Fettsäureoxidation entfallenden Sauerstoffverbrauchs nahm in beiden experimentellen Gruppen ab (Tab. 28).

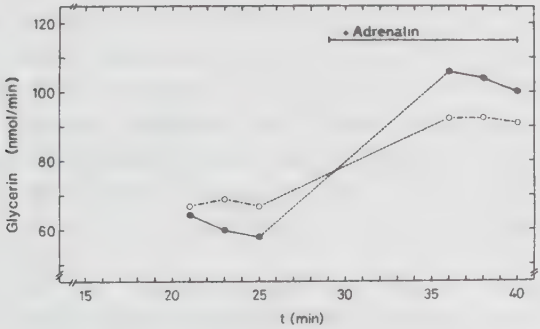


Abb. 13: Einfluß von Adrenalin auf die myokardiale Lipolyse im isoliert-perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten (nmol/min x g FG).
Glucose 5 mmol/l, Adrenalin 11 nmol/min, Insulin 5 U/l.
ohne Insulin (○)
mit Insulin (●)

	Glycerin		O_2-Verbrauch	
	(nmol/min)	(%)	(nmol/min)	(%)
Kontrolle	5,65 ± 1,15	100	4,12 ± 0,35	100
Kontrolle + Adren.	7,76 ± 1,21	137 *	10,57 ± 0,43	257 *
Diabetes	64,40 ± 3,44	100 *	5,58 ± 0,18	100
Diabetes + Adren.	87,40 ± 12,60	136 *	10,49 ± 0,17	188 *

Tab. 28: Einfluß von Adrenalin (nmol/min) auf die myokardiale Lipolyse und den Sauerstoffverbrauch (nmol/min x g FG). Glucose 5 mmol/l, $\bar{x}$ ± SEM, * $p < 0,05$.

Da durch Adrenalin zusätzlich zur Lipolyse die Herzfrequenz beschleunigt wurde, dp/dt_{max}, der Sauerstoffverbrauch sowie der koronare Fluß, aber auch die Glycogenolyse und die Lactatproduktion anstiegen, folgt nicht eindeutig, ob die Beschleunigung der Lipolyse durch Adrenalin einen direkten Effekt auf die TGL-Aktivität oder eine sekundäre Wirkung darstellt, die durch den auf Grund der vermehrten Arbeitsleistung insgesamt beschleunigten Metabolismus bzw. die gesteigerte Reveresterung von Fettsäuren zustande kommt.

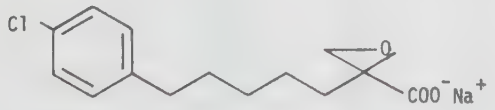
Die im SZ-diabetischen Herzen erhöhte myokardiale Lipolyse ist in keinem Fall auf einen β-adrenergen Mechanismus zurückzuführen, da die Vorbehandlung von Ratten mit Reserpin (1,8 mg/kg KG, s.c., 20 Stunden vor dem Experiment zur Entleerung der endogenen Catecholamin-Speicher) ebenso wie Perfusion von SZ-diabetischen Herzen mit dem β-Antagonisten Propranolol (2 µmol/l) keinen Einfluß auf die Lipolysegeschwindigkeit hatte (Rösen et al., 1981).

Zusammengefaßt ergibt sich, daß im Gegensatz zum Glucagon Insulin und Adrenalin die myokardiale Lipolyse beeinflussen können. Nach den vorliegenden Ergebnissen handelt es sich dabei aber nicht um eine direkte hormonelle Regulation der Lipolyse, sondern es ist anzunehmen, daß die Wirkungen beider Hormone eher eine indirekte Wirkung über eine vermehrte Reveresterung lipolytisch gebildeter Fettsäuren darstellen.

(c) Auswirkungen der Hemmung der Carnitinpalmitoyltransferasen auf die myokardiale Lipolyse und den Glucoseumsatz

Bei Langzeitperfusion von SZ-diabetischen Rattenherzen stieg parallel zur Verlangsamung der Lipolyse die Glucoseoxidation an. Dieser Befund legt nahe, daß die Oxidation von Fettsäuren, die lipolytisch aus endogenen Triglyceriden gebildet werden, inhibierend auf die Glucoseoxidation wirken.
Um diese kausale Verknüpfung von Fettsäureoxidation und Glucoseumsatz zu prüfen, wurde der Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien und damit ihre Oxidation inhibiert sowie parallel der Glucoseumsatz gemessen. Gleichzeitig sollte ein derartiger Versuchsansatz Hinweise darauf ergeben, ob die Fettsäureoxidation und die myokardiale Lipolyse in einem regulativen Zusammenhang stehen. Da der Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien von der Aktivität der Carnitinpalmitoyltransferasen abhängig ist (Mc Garry u. Foster, 1980) und die Mitochondrienfunktion selbst nicht gestört werden sollte, erschien die Hemmung der Carnitinpalmitoyltransferasen (CPT) ein geeigneter Mechanismus, um gleichzeitig den Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien und ihre Oxidation zu blockieren.

Als brauchbarer Inhibitor der CPT I erwies sich POCA, da es die CPT I-Aktivität, die durch die Bildung von Palmitoyl-^{3}H-Carnitin bestimmt werden kann (Abb. 14, Scholte et al., 1979), dosisabhängig hemmte (Abb. 17). Die halbmaximale Hemmung wurde durch eine Konzentration an POCA von 10 µmol/l erreicht.



POCA = 2-[5(4-Chlorphenyl)-pentyl]-oxiran-2-carboxylat

Im Gegensatz zu CPT I hatte POCA keinen Einfluß auf die Aktivität der CPT II - bestimmt durch den Austausch des Carnitinanteils im

Palmitoylcarnitin (Abb. 15, Scholte et al., 1979) - so daß davon ausgegangen werden kann, daß POCA selektiv den Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien blockiert.

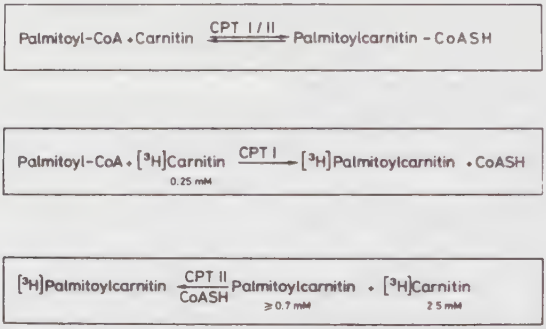


Abb. 14: Reaktionen der Carnitinpalmitoyltransferasen: CPT I und CPT II

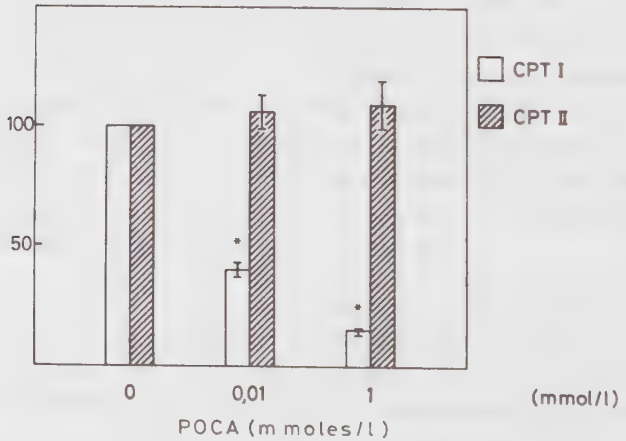


Abb. 15: Einfluß von POCA auf die myokardialen Carnitinpalmitoyltransferasen CPT I und CPT II. Die Aktivität der CPT ohne POCA diente als Kontrolle und wurde als 100 % Aktivität angenommen. * $p < 0,05$. Spezifische Aktivität der CPT (ohne POCA) CPT 1: 2 nmol/min. x mg Protein, CPT 2: 5,8 nmol/min x mg Prot. (25°C).

Einfluß der CPT I-Hemmung auf den Glucosestoffwechsel und die Lipolyse (in Abwesenheit von Insulin)

Bei Perfusion SZ-diabetischer Herzen mit POCA wurde die Lipolyse, gemessen am Glycerinausstrom, inhibiert. Der Glycerinausstrom fiel durch POCA von 35 ± 3,5 nmol/min. (n = 17) auf 10,2 ± 0,9 nmol/min. (n = 11), 25 % des Kontrollwertes, ab. Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch in Kontrollherzen; allerdings war hier der Glycerinausstrom sehr niedrig, so daß auch die Differenz im Glycerinausstrom (± POCA) sehr gering war (Tab. 29).

Da POCA keinen direkten Einfluß auf die Triacylglycerin-Hydrolase hatte, stellt die POCA-bedingte Hemmung der Lipolyse eine indirekte Folge der Inhibition des Fettsäuretransportes dar.

Während in Kontrollherzen die Produktion von Lactat und Pyruvat gemessen im venösen Effluat durch Perfusion mit POCA um 55 bzw. 30 % vermindert, die Oxidation exogener Glucose sowie die Glycolyse jedoch statistisch nicht signifikant beeinflußt wurden, stieg die Produktion von Pyruvat in SZ-diabetischen Herzen perfundiert mit POCA 1,6-fach an. Die Oxidation exogener Glucose wurde verdoppelt (Tab. 29).

Der Einfluß von POCA auf ausgewählte intrazelluläre Metabolite ergibt sich aus Tab. 30 und 31. Mit Ausnahme von Fructose-1,6-bisphosphat nahm in Kontrollherzen die stationäre Konzentration der untersuchten Metabolite durch 20-minütige Perfusion mit POCA ab. In SZ-diabetischen Herzen wurde der Gehalt an Glucose-6-P um 67 %, an α-Glycerin-P um 43 % und an Citrat um 71 % vermindert. Die Quotienten Lactat/Pyruvat und α-Glycerin-P/Dihydroxyaceton-P wurden unter POCA in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen kleiner.

Da die obigen Ergebnisse eine signifikante, wenn auch mäßige Beschleunigung der Oxidation von Glucose durch POCA als Folge der Lipolysehemmung erkennen ließen, wurde vermutet, daß unter den experimentellen Bedingungen die Verfügbarkeit von exogener Glucose limitiert (kein Insulin) und die Zeit der Perfusion mit POCA (20 min.) zu kurz war, um

(nmol/min)	Kontrolle					Diabetes				
	- POCA	(n)	+ POCA	(n)	$\frac{+POCA}{-POCA}$	- POCA	(n)	+ POCA	(n)	$\frac{+POCA}{-POCA}$
Lactat	226 ± 36	(22)	102 ± 19	(9)	0,45 *	770 ± 120	(18)	885 ± 58	(11)	1,12
Pyruvat	77 ± 8	(22)	53 ± 5	(9)	0,69 *	577 ± 141	(18)	989 ± 50	(4)	1,6 *
$^{14}CO_2$	339 ± 19	(11)	288 ± 48	(6)	0,85	51 ± 7	(11)	92 ± 33	(6)	1,81 *
Glycerin	1,8 ± 0,5	(21)	1,0 ± 0,3	(6)	0,55	35,4 ± 3,5	(18)	10,2 ± 0,9	(11)	0,29 *
O_2 (%)	37,8 ± 1,9	(11)	34,4 ± 3,9	(6)	0,91	5,7 ± 0,6	(11)	10,5 ± 9,5	(6)	1,84 *

Tab. 29: Einfluß von POCA auf den myokardialen Stoffwechsel von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten. Rattenherzen wurden mit Glucose (11 mmol/l) perfundiert; POCA 10 µmol/l zwischen 26. und 45. min..
$\bar{x}$ ± SEM, in P 2, * $p < 0,05$

die metabolischen Auswirkungen der Hemmung der CPT I auf den Glucosestoffwechsel voll zu entfalten.

Einfluß der Hemmung der CPT I auf den Glucosestoffwechsel des SZ-diabetischen Herzens bei hoher Insulinkonzentration

Herzen SZ-diabetischer Ratten wurden deshalb in Gegenwart von Insulin (5 U/l) 45 Minuten lang mit POCA perfundiert, um die Aufnahme exogener Glucose zu erleichtern. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen war die Lipolyse reduziert (- 30 %, Tab. 32). Die Lactatproduktion stieg 2,5-fach im Vergleich zu SZ-diabetischen Herzen (- POCA) an, während die Pyruvatfreisetzung durch POCA nicht signifikant beeinflußt wurde. Die Oxidation exogener Glucose stieg von 68 nmol/min unter diesen experimentellen Bedingungen auf 540 nmol/min 7,9-fach an und war nicht mehr signifikant von der in Kontrollherzen verschieden. Der Anteil am gesamten Sauerstoffverbrauch, der auf die Oxidation exogener Glucose entfiel, nahm auf 50 % zu.

(nmol/g FG)	- POCA	+ POCA	+POCA/-POCA
G6P	53 ± 2,6	41 ± 2	0,77 *
FDP	32 ± 3,0	34 ± 3	1,10
α-GP	68 ± 10	26 ± 2	0,38 *
DHAP	17 ± 1,4	13 ± 2	0,76 *
Pyruvat	28 ± 2,0	19 ± 1	0,68 *
Lactat	264 ± 24	151 ± 8	0,57 *
Citrat	57 ± 5,5	33 ± 3	0,58 *
G6P/FDP	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,66 *
α-GP/DHAP	4,3 ± 0,8	2,2 ± 0,4	0,51 *
L/P	0,8 ± 1,5	8,1 ± 0,4	0,75 *

Tab. 30: Einfluß von POCA (10 µmol/l) auf ausgewählte Metabolite in isoliert-perfundierten Herzen von Kontrollen. Glucose 11 mmol/l, * $p < 0,05$

(nmol/g FG)	- POCA	+ POCA	+POCA/-POCA
G6P	267 ± 34	88 ± 14	0,33 *
FDP	43 ± 3	48 ± 3	1,12
α-GP	60 ± 4	35 ± 5	0,58 *
DHAP	19 ± 1	21 ± 2	1,08
Pyruvat	131 ± 22	165 ± 15	1,26
Lactat	352 ± 31	357 ± 34	1,01
Citrat	314 ± 58	90 ± 15	0,29
G6P/FDP	6,9 ± 0,9	1,9 ± 0,5	0,27 *
α-GP/DHAP	3,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,57 *
L/P	4,5 ± 0,7	2,2 ± 0,1	0,48 *

Tab. 31: Einfluß von POCA (10 µmol/l) auf ausgewählte Metabolite in isoliert-perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten. Glucose 11 mmol/l, * $p < 0,05$

	Diabetes + Insulin		
(nmol/min)	- POCA (n)	+ POCA (n)	+POCA/-POCA
Lactat	1116 ± 122 (13)	2848 ± 135 (16)	2,5 *
Pyruvat	831 ± 149 (13)	856 ± 47 (16)	0,97 *
$^{14}CO_2$	69 ± 13 (9)	540 ± 43 (17)	7,9 *
Glycerin	49 ± 3 (13)	35 ± 3 (17)	0,7 *
O_2 (%)	7,5 ± 1,4 (9)	49,4 ± 3,4 (13)	6,7 *

Tab. 32: Einfluß von POCA auf den Stoffwechsel SZ-diabetischer Rattenherzen perfundiert mit Insulin. Glucose 11 mmol/l, Insulin 5 U/l, POCA 10 µmol/l (0 - 45. min.), $\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0,05$

Aus den angegebenen Daten und der spezifischen Aktivität des Pyruvates wurde die Geschwindigkeit der Glycolyse sowie der gesamten Pyruvatoxidation berechnet. Wie aus Tab. 33 folgt, wurde die Oxidation exogener

Glucose und Glycogen-Glucose gleichermaßen beschleunigt (70 % exogene Glucose, 30 % Glycogen-Glucose). Während im SZ-Diabetes (-POCA) lediglich 9 % des glycolytisch gebildeten Pyruvates zu CO_2 oxidiert wurden, erfolgte durch POCA eine Beschleunigung des PDH-Umsatzes, so daß 29 % der insgesamt in der Glycolyse umgesetzten Glucose vollständig oxidiert wurden, d.h. das PDH-Aktivitätsverhältnis stieg von 6 auf 42 % (PDH_a/PDH_{a+b}) an.

Enzymatische Messungen der PDH-Aktivität bestätigten diese Schlußfolgerung, da POCA (1 - 1000 µmol/l) einerseits keinen direkten Einfluß auf die PDH-Aktivität bzw. den Aktivitätszustand der PDH hatte, die Perfusion SZ-diabetischer Herzen mit POCA jedoch zur Aktivierung der PDH führte.

	- POCA	+ POCA	+POCA/-POCA
Glycolyse (C6 nmol/min)	1073 ± 196	2602 ± 251	2,5 *
Oxidation exogener Glucose (C6 nmol/min)	68 ± 13	540 ± 48	7,9 *
Glucoseoxidation total (C6 nmol/min)	100 ± 19	750 ± 67	7,5 *
$\frac{\text{Pyruvatoxidation}}{\text{Glycolyse}}$ (%)	9	29	2,9 *
PDH_a/PDH_{a+b} (%)	6	42	7,0 *

Tab. 33: Einfluß von POCA auf Glycolyse und Glucoseoxidation im SZ-diabetischen Rattenherzen perfundiert mit Glucose und Insulin. Glucose 11 mmol/l, Insulin 5 U/l, POCA 10 µmol/l, (0 - 45. min.). Die Glucoseoxidation wurde aus der CO_2-Produktion sowie der spezifischen Aktivität des Pyruvates im kardialen Effluat berechnet.
Gesamt-PDH 3558 nmol/min x g FG. $\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0,05$

Der myokardiale Gehalt an Glucose-6-P, Pyruvat und Citrat wurde durch Perfusion mit POCA auch in Gegenwart von Insulin vermindert, α-Glycerin-P nahm hingegen zu (Tab. 34).

(nmol/g FG)	- POCA	+ POCA	+POCA/-POCA
G6P	258 ± 22	96,8 ± 9,0	0,38 *
FDP	57 ± 6,8	59,5 ± 4,0	1,04
α-GP	88 ± 11,4	145 ± 16,8	1,65 *
DHAP	23,8 ± 2,4	26,6 ± 1,7	1,12
Pyruvat	173 ± 23	114 ± 9,0	0,66 *
Lactat	604 ± 63	650 ± 46	1,08
Citrat	324 ± 48	90,5 ± 6,3	0,28 *
G6P/FDP	7,24 ± 2,09	1,61 ± 0,08	0,22 *
α-GP/DHAP	4,89 ± 0,92	5,29 ± 0,45	1,08
L/P	4,20 ± 0,50	5,85 ± 0,33	1,39 *

Tab. 34: Ausgewählte Metabolite im SZ-diabetischen Rattenherzen nach Perfusion mit Insulin und POCA.
Glucose 11 mmol/l, Insulin 5 U/l, POCA 10 µmol/l.
$\bar{x} \pm$ SEM in P 2, * $p < 0,05$

Diese Befunde weisen insgesamt auf eine Aktivierung der Glycolyse im SZ-diabetischen Herzen als Folge der Hemmung der CPT I hin. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glycolyse ist unter diesen Bedingungen nicht die Phosphofructokinase, sondern die Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion, wie sich aus den stationären Konzentrationen der Herzmetabolite ergibt.

Während die Glycolyse und Pyruvatoxidation durch Perfusion diabetischer Herzen mit POCA beschleunigt wurde, hatte POCA keinen Einfluß auf den Einbau von Glucose in die myokardiale Glyogenfraktion, die Hemmung der Lipolyse und Fettsäureoxidation wirkte sich nicht fördernd auf die im Diabetes inhibierte Glycogensynthese aus.

Insulinsensitivität des SZ-diabetischen Herzens bei Hemmung der CPT I

Da hohe Dosen von Insulin in Gegenwart von POCA in SZ-diabetischen Herzen den Glucoseumsatz signifikant beeinflußten, wurde die Dosisabhängigkeit des Insulineinflusses auf die Glucoseoxidation und Lactatproduktion untersucht.

Wie Abb. 16 zeigt, bewirkte bereits eine sehr niedrige Konzentration an Insulin (5 mU/l = 40 pmol/l) eine signifikante Steigerung der Glucoseoxidation in diabetischen Herzen, die gleichzeitig mit POCA perfundiert wurden. Eine maximale Stimulation der Glucoseoxidation wurde durch eine Insulinkonzentration von 50 mU/l (0,4 nmol/l) erreicht.

Die Abhängigkeit der Lactatproduktion von der Insulinkonzentration bei Perfusion SZ-diabetischer Herzen mit Glucose zeigt Abb. 17. Während ohne POCA selbst durch eine hohe Konzentration an Insulin (5 U/l = 40 nmol/l) nur eine geringfügige Steigerung der Lactatproduktion in SZ-diabetischen Herzen erzielt wurde, stieg die Lactatabgabe bei gleichzeitiger Perfusion der Herzen mit POCA deutlich an. Wie bei der Glucoseoxidation wurde eine maximale Beschleunigung durch 50 mU/l (0,4 nmol/l) Insulin erreicht.

Die Insulinsensitivität des SZ-diabetischen Herzens unterschied sich bei Perfusion mit POCA nicht länger von der in Kontrollherzen.

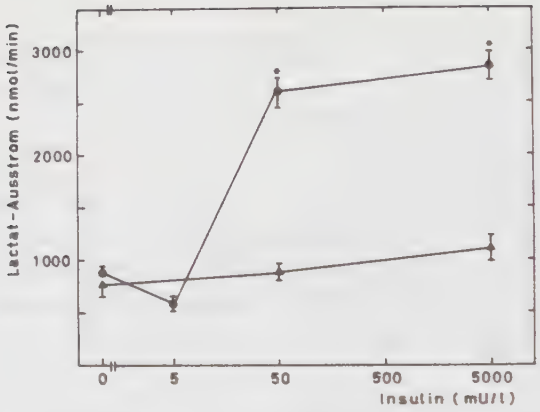


Abb. 16: Einfluß von POCA auf die Insulinabhängigkeit der Glucoseoxidation in isoliert-(Glucose)perfundierten SZ-diabetischen Rattenherzen (nmol/min x g FG). POCA 10 µmol/l, Glucose 11 mmol/l, * $p < 0,05$
mit POCA (●) ohne POCA (▲)

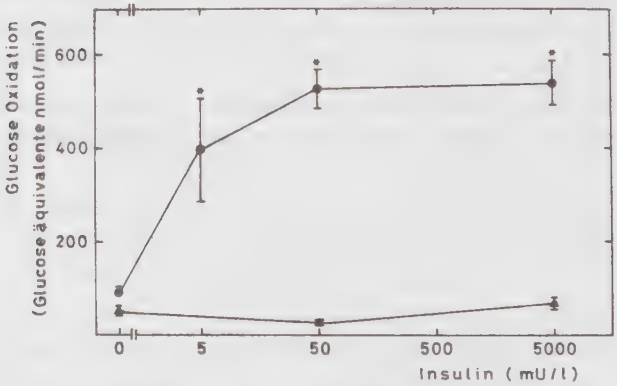


Abb. 17: Einfluß von POCA auf die Insulinabhängigkeit der Lactatproduktion in isoliert-(Glucose)perfundierten SZ-diabetischen Rattenherzen (nmol/min x g FG. POCA 10 µmol/l, Glucose 11 mmol/l, * $p < 0,05$
mit POCA (●) ohne POCA (▲)

Zusammenfassung:
Wechselwirkungen zwischen Lipolyse und Glucosemetabolismus im isoliert-perfundierten Rattenherzen.

Auf Grund der dargestellten Ergebnisse ist anzunehmen, daß im SZ-Diabetes durch die Lipolyse endogener Triglyceride Fettsäuren im Herzen zur Verstoffwechselung zur Verfügung stehen, die zur Inhibierung der Glucoseoxidation auch unter Perfusionsbedingungen führen.
Um den Zusammenhang zwischen Lipolyse endogener Triglyceride und dem Glucoseumsatz in isoliert-perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten und die Regulation der Lipolyse zu charakterisieren, wurden die Lipolyse und die Oxidation lipolytisch gebildeter Fettsäuren modifiziert.

Langzeitperfusionen:

(1) Nach 160 Minuten Perfusion waren im SZ-diabetischen Herzen die endogenen Triglyceridreserven auf 1,6 µmol/g FG gefallen, die Lipolyse verminderte sich auf Basalwerte.

(2) Die myokardiale Lipolyse folgte bezüglich der endogenen Triglyceride einer Sättigungskinetik. Bei einem endogenen Triglyceridgehalt von 1 - 2 µmol/g FG wurde eine basale Lipolyse wie in Kontrollherzen, bei 5 - 6 µmol/g FG eine maximale Lipolyse von 70 - 80 nmol Glycerin/min. beobachtet.

(3) Parallel zur Reduktion der Lipolyse stieg in SZ-diabetischen Herzen die Glucoseoxidation auf das 8 - 10-fache des Ausgangswertes an und erreichte Umsatzraten, die sich nicht signifikant von denen in Kontrollherzen unterschieden.

(4) Der Glycogengehalt des SZ-diabetischen Herzens verminderte sich auf 1 - 2 % des Ausgangswertes unabhängig von Insulin, während in Kontrollherzen mit Insulin eine Nettoglycogensynthese stattfand.

Hormonelle Regulation der myokardialen Lipolyse:

(1) Glucagon hatte keinen Einfluß auf die myokardiale Lipolyse.

(2) Insulin bedingte eine Rechtsverschiebung der Substrat-Geschwindigkeitskurve und führte einerseits zu einem vermehrten myokardialen Glycerinausstrom, verminderte aber andererseits den Nettoumsatz an Triglyceriden. Es ist anzunehmen, daß Insulin die Reveresterung von lipolytisch gebildeten Fettsäuren fördert und somit indirekt über eine vermehrte Resynthese von Substrat-Triglyceriden die Lipolyse beschleunigt.

(3) Adrenalin beschleunigte die Lipolyse, parallel aber den Sauerstoffverbrauch, dp/dt_{max} sowie die Herzfrequenz. Auch in KCl-stillgestellten Herzen konnte eine Aktivierung der myokardialen Lipolyse nur bei gleichzeitigem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs erreicht werden.
Da gleichzeitig der Glycogenverbrauch sowie die Lactat- und Pyruvatproduktion unter Adrenalin anstiegen, ist eine indirekte Beeinflussung der myokardialen Lipolyse durch Adrenalin wahrscheinlich.

(4) Die im SZ-diabetischen Herzen erhöhte Lipolyse ist nicht auf ß-adrenerge Mechanismen zurückzuführen, da Reserpinisierung der Versuchstiere sowie Perfusion der isolierten Herzen mit Propranolol keinen Einfluß auf die myokardiale Lipolyse hatte.

Hemmung des Fettsäuretransportes durch POCA:

(1) POCA hemmte selektiv die CPT I in den Perfusionsexperimenten bei verwendeten Konzentrationen von 10 µmol/l.

(2) POCA führte zu einer Hemmung der myokardialen Lipolyse und damit sekundär zu einem verminderten Ausstrom von Glycerin, ohne einen direkten Einfluß auf die TG-Lipase auszuüben. Die Oxidation von Glucose wurde mit POCA und Insulin auf Kontrollwerte beschleunigt.

(3) Der glycolytische Umsatz von Glucose erreichte mit Insulin und POCA in SZ-diabetischen Herzen eine Geschwindigkeit, die die von Kontrollherzen übertraf. Die stationären Konzentrationen von Glucose-6-P und Citrat nahmen unter POCA ab und lagen unterhalb der Kontrollwerte.

(4) Die PDH wurde durch Perfusion von Herzen mit POCA aktiviert, was metabolisch bedingt sein muß, da POCA keine direkte Wirkung auf die PDH hatte.

(5) Die Glycogensynthese des SZ-diabetischen Herzens wurde auch bei Perfusion mit POCA durch Insulin nicht beschleunigt und war im Vergleich zu Kontrollen gehemmt.

(6) Die Insulinsensitivität des SZ-diabetischen Herzens wurde bei Perfusion mit POCA hinsichtlich der Lactatproduktion und Glucoseoxidation, nicht aber der Glycogensynthese normalisiert.

Somit erscheint eine direkte hormonelle Regulation der myokardialen Lipolyse als nicht wahrscheinlich. Die Untersuchungen des CPT Hemmstoffes POCA sowie kinetische Daten legen vielmehr eine Produkthemmung der TG-Lipase nahe. Die metabolischen Wirkungen einer Entleerung der myokardialen Triglyceridspeicher (Langzeitperfusion) als auch die metabolischen Auswirkungen von POCA auf das isoliert perfundierte SZ-diabetische Rattenherz können als Folge des verminderten bzw. inhibierten Transportes von Fettsäuren in die Mitochondrien verstanden werden. Auf Grund dieser verminderten Zufuhr von Fettsäuren ist zu erwarten, daß die ß-Oxidation von Fettsäuren verlangsamt wird mit der Folge einer Aktivierung der PDH. Da infolge des verlangsamten oxidativen Umsatzes von Fettsäuren auch der Citratgehalt im Myokardium abnimmt, kommt es zur Aktivierung der PFK und Glycolyse. Auch die Hemmung der Hexokinase durch Glucose-6-P sollte unter diesen experimentellen Bedingungen entfallen. Da die verminderte Insulinsensitivität der Glucoseaufnahme und Glycolyse durch POCA normalisiert wurde, ist

davon auszugehen, daß diese metabolisch durch den exzessiven Lipidstoffwechsel im Diabetes bedingt ist. Die Insulinresistenz der Glycogensynthese muß hingegen auf einem anderen Mechanismus beruhen (vgl. Diskussion).

C 4. Eigenschaften und Regulation der Triacylglycerin-Hydrolase

Da die Regulation der myokardialen Lipolyse nach den bisher dargelegten Ergebnissen in einer engen Beziehung zum Glucosestoffwechsel steht und Perfusionsexperimente am isolierten Herzen nur indirekte Schlußfolgerungen auf die Regulation der Lipolyse erlauben, wurde die auf Grund von Perfusionsexperimenten erstellte Hypothese der Substrat- und Produktregulation der Triacylglycerin-Hydrolase (TGL) durch enzymatische Untersuchungen der involvierten Enzyme erhärtet. Dies war insbesondere notwendig, da die myokardiale TGL-Aktivität bisher wenig definiert wurde und widersprüchliche Ergebnisse berichtet wurden (vgl. Einleitung).

Die myokardiale Triacylglycerin-Hydrolase (TGL) wurde entweder über die Freisetzung von Ölsäure aus radioaktiv markiertem Triolein oder fluorimetrisch durch die Spaltung von 4-Methylumbelliferyloleat (4-MUO) gemessen. Während die Substratspezifität bei der radioaktiven Methode höher ist, hat die fluorimetrische Bestimmung den Vorteil der höheren Empfindlichkeit wie auch den der kinetischen Messung.

Die pH-Abhängigkeit der TGL gemessen mit beiden Methoden wies zwei differente pH-Optima bei pH 4,5 - 5,0 (TGL 4,5) und pH 7,4 - 8,0 (TGL 7,4) auf; die Trennung dieser pH-Optima war bei der Verwendung von 4-MUO als Substrat der TGL nicht so scharf ausgeprägt wie bei der Verwendung von Triolein (Abb. 18 und 19).

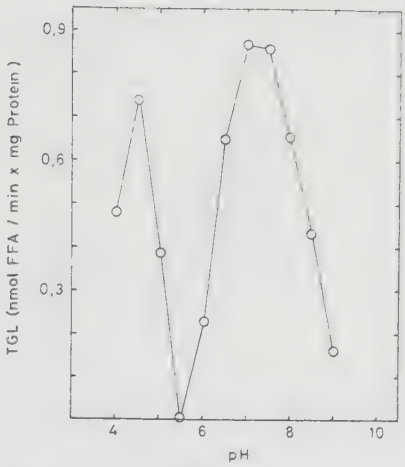


Abb. 18: pH-Abhängigkeit der TG-Lipase mit Triolein als Substrat. Die TGL-Aktivität wurde mit Triolein (1,7 mmol/l) als Substrat bestimmt.
pH 4 - 6 Acetat-Puffer, pH 7 - 8 TRIS-HCl, pH 8 - 9 Glycin-Puffer, jeweils 0,1 mol/l, 37°C

Für Triolein wurde die Abhängigkeit von der Substratkonzentration bei pH 7,4 bis zu einer Konzentration von 7 mmol/l Triolein untersucht. Die erhaltene Sättigungskurve erreichte ein Maximum bei ca. 3 - 4 mmol/l Triolein. Die Michaelis-Menten Konstante ergab sich für Triolein zu K_m = 1,6 mmol/l, V_{max} zu 2 - 3 nmol/min. x mg Protein (Abb. 20).

Auf Grund der dargestellten Substratabhängigkeit würde ein myokardialer Triglyceridgehalt von 1 - 2 µmol/g FG, wie er in Kontrollherzen bestimmt wurde, unter der Annahme, der TGL als Substrat vollständig zur Verfügung zu stehen, nur eine minimale Lipolysegeschwindigkeit erlauben. Erst die Zunahme des myokardialen Triglyceridgehaltes, wie er im SZ-diabetischen Herzen beobachtet wurde, verschöne die Enzymaktivität in den Bereich der Substratsättigung und bedingte somit allein vom Substratangebot her eine wesentlich höhere Lipolyse-

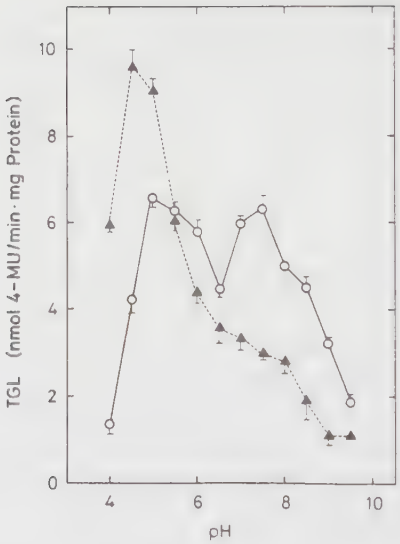


Abb. 19: pH-Abhängigkeit der TG-Lipase mit 4-MUO als Substrat sowie der Einfluß von Phosphatidylserin auf die pH-Abhängigkeit der TGL Aktivität.
Die TGL wurde fluorimetrisch bestimmt.
Phosphatidylserin (60 µmol/l) (▲)
ohne Phosphatidylserin (○)
$\bar{x} \pm$ SEM (n = 3), 37°C

geschwindigkeit als in Kontrollherzen, unter der Voraussetzung, daß Kompartimentierungen des Substrates und der TGL außer Betracht gelassen werden können.

Die fluorimetrisch in beiden pH-Optima gemessene Substratabhängigkeit ergab in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk (1936) lineare Beziehungen (Abb. 21).
Für 4-MUO als Substrat betrugen die apparenten Michaelis-Menten Konstanten für beide pH-Optima 12 µmol/l. Auch die ermittelten Maximalgeschwindigkeiten unterschieden sich nur wenig:

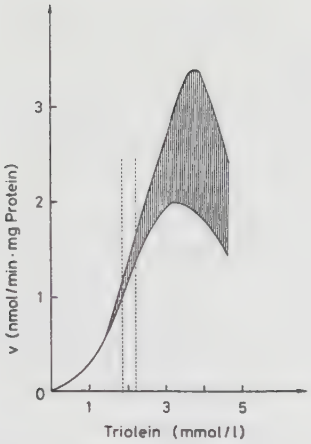


Abb. 20: Abhängigkeit der TG-Lipase-Aktivität von der Triolein-Konzentration.
pH 7,4 Triolein 1,7 mmol/l, 37°C. Der Bereich der spezifischen Aktivitäten von 4 verschiedenen Präparationen ist angegeben.

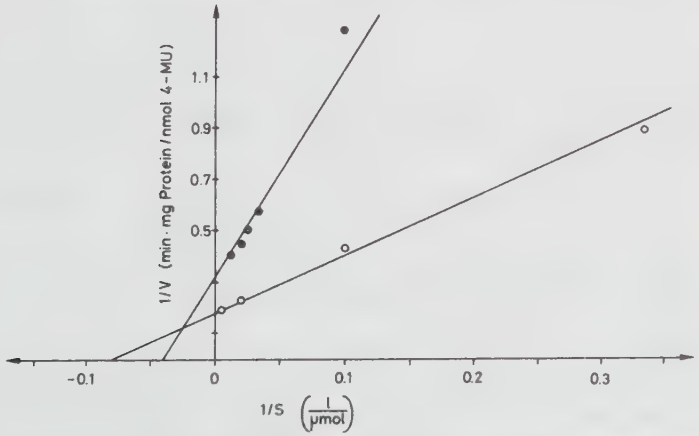


Abb. 21: Einfluß von Phosphatidylserin auf die Substratabhängigkeit der TG-Lipase (4-MUO).
pH 7,4 4-MUO 150 µmol/l, 37°C
mit Phosphatidylserin (61 µmol/l) (●)
ohne Phosphatidylserin (○)

V_{max}(pH 7,4) = 5,6 nmol/min x mg Protein
V_{max}(pH 4,5) = 4,5 nmol/min x mg Protein

Die Affinität von 4-MUO zu TGL 7,4 ist somit mehr als 50-fach größer als von Triolein, während sich die Maximalgeschwindigkeiten nicht in dem Maße unterscheiden.

Die angegebenen kinetischen Konstanten und enzymatischen Aktivitäten der TGL sind allerdings mit Einschränkungen zu betrachten, da ihre Aktivitäten stark von dem Emulgierungszustand des Substrates der im wäßrigen Medium schwer löslichen Substrate abhängt. Dies sei beispielhaft am Einfluß von Phospholipiden auf die TGL-Aktivitäten angedeutet, die nach Boggs (1980) Emulsionen von Lipiden sowie die Größe der Lipidvesikel stabilisieren, die als Substrate der Lipaseaktivitäten verwendet werden. Zusatz von Phosphatidylserin zur Lipidemulsion bedingte eine Aktivierung von TGL 4,5, konzentrationsabhängig gemessen sowohl mit 4-MUO als auch mit Triolein als Substrat. Auf TGL 7,4 hatte Phosphatidylserin einen konzentrationsabhängigen biphasischen Einfluß: niedrige Konzentrationen (< 10 µmol/l) aktivierten TGL 7,4, höhere Konzentrationen (>10 µmol/l) führten zur Inaktivierung der TGL 7,4. Die in Abb. 19 dargestellte Verschiebung der pH-Abhängigkeit der TGL-Aktivitäten durch Phosphatidylserin spiegelt diese aktivierenden und inaktivierenden Einflüsse von Phosphatidylserin wieder.

Wie aus Abb. 21 hervorgeht, ist der Einfluß von Phosphatidylserin auf eine Veränderung der apparenten K_m zurückzuführen:
Die apparente K_m wurde von 12,2 $\pm$ 1,5 auf 25,3 $\pm$ 1,7 µmol/l verdoppelt, V_{max} von 5,6 $\pm$ 0,1 auf 3,2 $\pm$ 0,1 nmol/min x mg Protein verringert.

Im Gegensatz zum neutralen pH-Bereich führte Phosphatidylserin bei pH 4,5 zu einer Verminderung der apparenten K_m von 12,8 $\pm$ 1,1 auf 7,5 $\pm$ 0,5 mmol/l; parallel stieg die Maximalgeschwindigkeit V_{max} von 4,5 $\pm$ 0,1 auf 6,8 $\pm$ 0,9 nmol/min x mg Protein an.

Im Gegensatz zu Phosphatidylserin hemmte Lecithin (63 µmol/l) beide TGL-Aktivitäten. Es ist deshalb zu vermuten, daß nicht der Phosphatidsäureanteil als solcher bestimmenden Einfluß auf die TGL ausübt, sondern die Ladung des Phospholipids entscheidend ist und insbesondere die Serincarboxylgruppe die Vesikelbildung des Substrates erleichtert. Eine Protonierung der Carboxylgruppe erschwert vermutlich die Vesikulierung des Lipidsubstrates und inhibiert damit die Substrat-Enzym-Wechselwirkung.

Produkte der TGL-Aktivitäten:

Bei der Bestimmung der Lipase-Aktivität über die Menge der gebildeten Fettsäuren wird nicht unterschieden, ob das Substrat Triolein vollständig hydrolytisch zu Ölsäure und Glycerin hydrolysiert wird oder eine partielle Hydrolyse zu Mono- und Diglyceriden erfolgt. Um das Produktspektrum der TGL 4,5 und TGL 7,4 zu untersuchen, wurden deshalb parallel die Menge der gebildeten Ölsäure als Maß der totalen Lipase-Aktivität und die Glycerinbildung als Maß für die totale Hydrolyse von Triolein bestimmt.

TGL 7,4 wies eine spezifische Aktivität von 0,7 $\pm$ 0,1 nmol FFA/min x mg Protein auf; aus der Menge des gebildeten Glycerins (0,18 $\pm$ 0,02 nmol/min x mg Protein) errechnet sich eine Aktivität von 0,54 $\pm$ 0,06 nmol FFA/min x mg Protein, d.h. 82 % des Trioleins wurden durch TGL 7,4 vollständig zu Ölsäure und Glycerin hydrolysiert, 17,5 % der Fettsäuren entstammten einer partiellen Hydrolyse von Triolein zu Mono- und Diglyceriden (Abb. 22).

Im Gegensatz zu TGL 7,4 konnte bei pH 4,5 trotz einer spezifischen Aktivität von 0,31 $\pm$ 0,04 nmol FFA/min x mg Protein kein Glycerin als Hydrolyseprodukt nachgewiesen werden. Während TGL 7,4 somit einem Enzymkomplex aus Tri-, Di- und Monoglycerid-Hydrolase-Aktivität darstellt, war bei pH 4,5 keine Monoglycerid-Hydrolase-Aktivität nachweisbar.

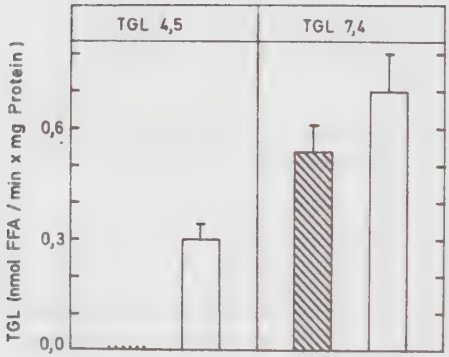


Abb. 22: Vergleich der TG-Lipase-Aktivität gemessen über die Bildung von Glycerin und die Freisetzung von Fettsäuren aus Triolein (1,7 mmol/l, 60 min., 37°C) bei pH 4,5 und pH 7,4.

Aktivität berechnet aus Glycerinfreisetzung: ▨

Aktivität berechnet aus der Bildung von Fettsäuren: □

Aus der weitgehenden Übereinstimmung der spezifischen Aktivitäten von TGL 7,4 bestimmt einerseits durch die Bildung von Glycerin, das sowohl aus exogenem Triolein als auch durch Hydrolyse endogener Triglyceridreserven entstehen kann, sowie andererseits durch die Freisetzung von radioaktiven Fettsäuren aus exogenem, radioaktivem Triolein, folgt weiterhin, daß eine bevorzugte Hydrolyse endogener Triglyceride, wie sie von Wise u. Jungas (1978) für die Fettgewebslipase diskutiert wurde, für das Herz ausscheidet.

Abgrenzung der TGL gegenüber Lipoproteinlipase-Aktivitäten

Herzgewebe weist neben Triacylglycerin-Hydrolase auch Lipoproteinlipase-Aktivität (LPL) auf, ein Glycoproteid, das Triglyceride aus

Serum-Lipoproteinen am Kapillarendothel hydrolysiert und so ihre intrazelluläre Aufnahme ermöglicht (Björntorp u. Furmann, 1962, Korn, 1955). Die LPL kann durch folgende Eigenschaften von der TGL 7,4 abgegrenzt werden: sie hat ein pH-Optimum bei 8,0 - 8,5, ist durch 0,5 mg Protaminsulfat/ml und 0,5 mol/l NaCl hemmbar (Haimd et al., 1973, Jesmok et al., 1976, Severson et al., 1979, Twu et al., 1975) und kann durch Heparin vom Kapillarendothel gelöst werden (Jansen et al., 1975).
Da die Perfusion von Herzen mit Heparin (20 U/ml, 15 min) keinen Einfluß auf die spezifischen Aktivitäten von TGL 4,5 und TGL 7,4 hatte, die TGL 7,4 durch Protaminsulfat nicht gehemmt wurde und zudem das pH-Optimum bei pH 8,0 bereits überschritten ist, liegt der Schluß nahe, daß die TGL 7,4 keine Lipoproteinlipase-Aktivität darstellt.
Zudem wurden in Kardiocyten isoliert aus adulten Ratten TGL-Aktivitäten mit vergleichbarer pH-Abhängigkeit und spezifischer Aktivität wie in Präparationen aus isoliert-perfundierten Herzen nachgewiesen (Rösen, Eckel, unveröffentlicht).

Einfluß von SZ-Diabetes auf die myokardiale TGL-Aktivitäten

Induktion eines SZ-Diabetes führte zu einer Verminderung der spezifischen TGL-Aktivitäten gemessen bei pH 5,0, 7,4 und 8,5, die durch Vorbehandlung der Tiere mit Insulin bei pH 8,5 und 7,4 vollständig, bei pH 5,0 teilweise verhindert werden konnte (Abb. 23, Tab. 35). Eine ähnliche Verminderung der TGL-Aktivitäten konnte auch in Herzen nicht-ketotischer, nicht-diabetischer Ratten nachgewiesen werden (Abb. 24, Tab. 36).

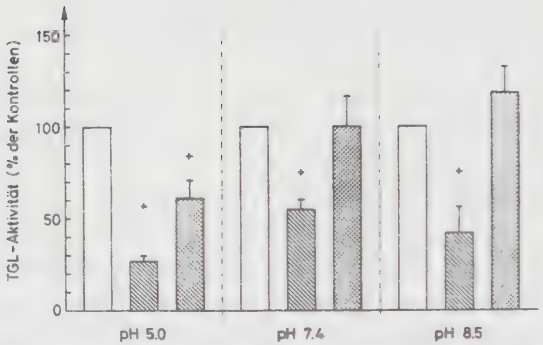


Abb. 23: Einfluß von SZ-Diabetes auf die TG-Lipase-Aktivitäten im Rattenherzen.
$\bar{x}$ + SEM, n = 10, * $p < 0,05$
Kontrolle: □
SZ-Diabetes: ▨
SZ-Diabetes, Insulin behandelt: ▩

pH	Kontrolle (nmol/mg Protein x min.)	(%)	SZ-Diabetes (nmol/mg Protein x min.)	(%)	SZ-Diabetes + Insulin (nmol/mg Protein x min.)	(%)
5,0	0,41 ± 0,04	100	0,11 ± 0,02	27 *	0,25 ± 0,04	61 *
7,4	0,41 ± 0,05	100	0,22 ± 0,02	54 *	0,41 ± 0,07	100
8,5	0,31 ± 0,06	100	0,13 ± 0,05	42 *	0,37 ± 0,04	119

Tab. 35: Spezifische Aktivitäten der myokardialen TG-Lipase-Aktivitäten im SZ-diabetischen Rattenherzen.
$\bar{x}$ ± SEM, n = 10, * $p < 0,05$

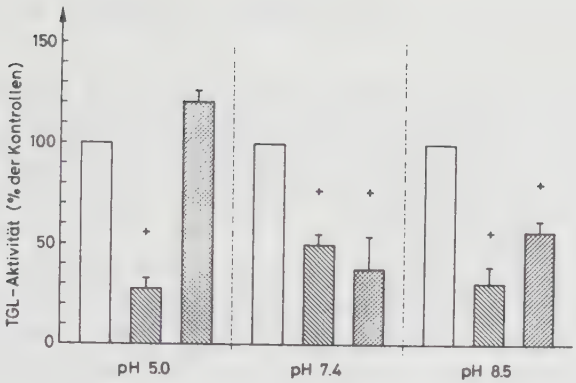


Abb. 24: Einfluß eines „chronischen Diabetes" auf die TG-Lipase-Aktivitäten im Rattenherzen.
$\bar{x}$ + SEM, n = 10, * $p < 0,05$
Kontrolle: ☐
chronischer Diabetes: ▨
chron. Diabetes, Insulin behandelt: ▩

pH	Kontrolle (nmol/mg Protein x min.)	(%)	chron. Diabetes (nmol/mg Protein x min.)	(%)	chron.Diabetes+Insulin (nmol/mg Protein x min.)	(%)
5,0	0,41 ± 0,04	100	0,11 ± 0,02	27 *	0,49 ± 0,20	120 *
7,4	0,41 ± 0,05	100	0,20 ± 0,02	49 *	0,15 ± 0,07	37 *
8,5	0,31 ± 0,06	100	0,10 ± 0,03	32 *	0,23 ± 0,02	74 *

Tab. 36: Spezifische Aktivitäten der TG-Lipasen im „chronischen Diabetes".
$\bar{x}$ ± SEM, n = 10, * $p < 0,05$

Einfluß von Catecholaminen und c-AMP/Proteinkinase auf die TGL-Aktivitäten

Auf Grund von Untersuchungen am isoliert-perfundierten Herzen und an Fettgewebe, in denen eine Aktivierung der Lipolyse durch Catecholamine beobachtet wurde (Hron et al., 1977), wurde untersucht, ob die myokardiale TGL über das c-AMP/Proteinkinase-System durch Phosphorylierung aktiviert werden kann.
Zur Klärung dieser Hypothese wurde eine TGL-Präparation 10 min. mit 1,59 mU Proteinkinase und einem c-AMP-abhängigen Aktivierungssystem (5 mmol/l $MgCl_2$, 0,5 mmol/l ATP, 0,01 mmol/l c-AMP, 1 mmol/l IBMX, 1 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4) inkubiert, mit dem Khoo und Steinberg (1980) eine 16-fache Aktivitätserhöhung an TGL aus Fettgewebe erzielten. Bei der anschließenden Lipasebestimmung im radioaktiven Test konnte jedoch keine Veränderung der myokardialen TGL im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Auch Vorinkubation mit Adrenalin, Glucagon und Dibuturyl-c-AMP hatten keinen Einfluß auf die TGL-Aktivität.

NaF (100 mmol/l), ein Inhibitor der Phosphoproteinphosphatasen, inhibierte die TGL nahezu vollständig, wenn es im enzymatischen Ansatz vorlag, hatte aber bei der Präparation keinen Einfluß auf die spezifischen Aktivitäten der TGL 4,5 und TGL 7,4, so daß eine Desaktivierung durch Dephosphorylierung während der Präparation ausgeschlossen werden kann.

Auch der Entzug von divalenten Kationen durch 1 mmol/l EDTA oder der Zusatz von Ca^{++} (10 mmol/l) mit und ohne $MgCl_2$ zeigte weder auf die saure noch auf die neutrale TGL-Aktivität Wirkung.

Hemmung der TGL-Aktivitäten

Auf Grund der Hemmung der Lipolyse des isoliert-perfundierten Herzens durch Fettsäuren und Ketonkörper (Neely et al., 1969, Hron et al., 1978, Rösen et al., 1981) sowie durch Inhibitoren der CPT I (C 3) wurde vermutet, daß die TGL 7,4 einer Produkthemmung unterliegt. Wie Abb. 25

zeigt, wurde TGL 7,4 durch Palmitoylcarnitin dosisabhängig inhibiert.

Ein Verhältnis von Triolein/Palmitoylcarnitin von 1,7 war für eine 50 % Hemmung erforderlich. Auch fluorimetrisch war die Hemmung der TGL-Aktivitäten durch Palmitoylcarnitin nachweisbar: TGL 4,5 wurde bereits bei einem Substrat/Inhibitor-Verhältnis von 19 zu 50 % gehemmt, während bei TGL 7,4 niedrigere Substrat/Inhibitor Relationen (ca. 1,5) für eine 50 % Hemmung erforderlich waren. Da Carnitin und Acetylcarnitin keinen Einfluß auf die TGL-Aktivitäten aufwiesen, ist die inhibitorische Wirkung an den langkettigen Acylrest des Carnitinesters gebunden.

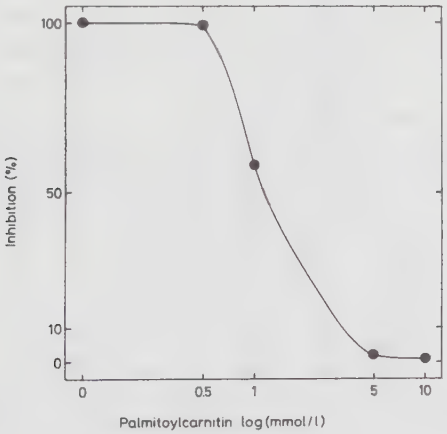


Abb. 25: Hemmung der TGL 7,4 durch Palmitoylcarnitin.
Triolein 1,7 mmol/l, n = 3

Auch die als weitere Reaktionsprodukte in Frage kommenden 1,2-Diolein, Monoolein und Ölsäure führten zur Hemmung der TGL 7,4 und TGL 4,5. Auf Grund der geringen Löslichkeit konnten allerdings nur begrenzte Konzentrationsverhältnisse untersucht werden, weshalb auf eine eingehendere Charakterisierung der Inhibitionskinetik verzichtet wurde.

C 5. Adenylcyclasen, Phosphorylase und Glycogensynthase-Aktivitäten im SZ-diabetischen Rattenherzen

Zur Interpretation der Befunde zur Glycogenolyse und Glycogensynthese wurden die Ergebnisse der Perfusionsexperimente durch enzymatische Untersuchungen der Adenylcylclase, der Glycogenphosphorylase und Glycogensynthase ergänzt.

Adenylcyclase

Die spezifische Aktivität der Adenylcyclase wurde in nicht-perfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten bestimmt. Die spezifische Aktivität der Adenylcyclase betrug in Kontrollherzen 69 ± 9,4 pmol/min x mg Protein (n = 5) und 65,4 ± 5,4 pmol/min x mg Protein in SZ-diabetischen Herzen. SZ-Diabetes hatte somit weder signifikanten Einfluß auf die spezifische Aktivität noch auf die Gesamtaktivität der myokardialen Adenylcyclase.

	Kontrolle (pmol/g FG)(n)	SZ-Diabetes (pmol/g FG)(n)	Kontrolle / SZ-Diabetes
c-AMP	475 ± 25 (5)	503 ± 22 (4)	1,1
c-GMP	59 ± 6 (5)	54 ± 1 (4)	0,9
c-AMP / c-GMP	8,0	9,3	

Tab. 37: Myokardialer Gehalt an cyclischen Nucleotiden in nicht-perfundierten, gefriergestoppten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten.
$\bar{x}$ ± SEM

Der Gehalt an c-AMP war im SZ-diabetischen Herzen im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht (+ 6 %), der myokardiale Gehalt an c-GMP erniedrigt (- 9 %). Die Unterschiede im Gehalt an cyclischen Nucleotiden zwischen Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen konnten jedoch statistisch nicht gesichert werden.

Glycogenphosphorylase

Im nicht-perfundierten Herzen lag die Phosphorylase bei Kontrollen zu 13 %, im SZ-Diabetes zu 7 % in der phosphorylierten und damit aktiven Form (Phosphorylase a) vor. Die Gesamtaktivität (Phosphorylase a+b) betrug zwischen 160 - 180 nmol/min x mg Protein und war in beiden Herzgruppen nicht unterschiedlich.

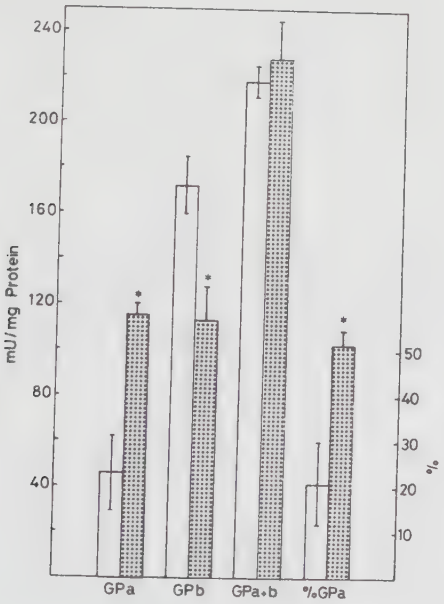


Abb. 26: Einfluß von SZ-Diabetes auf die myokardiale Phosphorylase-Aktivität.
Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten wurden 10 min. perfundiert und die Phosphorylase-Aktivität bestimmt. Die Phosphorylase a (GPa) ergibt sich aus der Messung der Aktivität ohne AMP, die Gesamt-Phosphorylase-Aktivität Phosphorylase a+b,(GPa+b) wurde mit AMP (1 mmol/l) bestimmt.
$\bar{x} \pm$ SEM, n = 5, *p< 0,05

Kontrolle: ☐

SZ-Diabetes: ⚄

Wurden die Herzen vor der Präparation der Phosphorylase perfundiert (37°C, 11 mmol/l Glucose, 10 min.), kam es zu einer raschen Aktivierung der Phosphorylase-Aktivität. Während der Anteil der Phosphorylase a an der Gesamtaktivität in Kontrollen nach 10-minütiger Perfusion auf 20,8 % zunahm, stieg im SZ-Diabetes der Anteil der Phosphorylase a an der Gesamtaktivität auf 51 % an. Entsprechend der Zunahme der Phosphorylase a-Aktivität verringerte sich die Phosphorylase b-Aktivität, was insbesondere bei SZ-diabetischen Ratten deutlich wird. Die Phosphorylase ist demnach unter in vivo Bedingungen im ketoazidotischen Herzen niedriger als in Kontrollherzen, bei Perfusion erfolgte jedoch eine rasche Aktivierung, so daß das Verhältnis der Phosphorylase a-Aktivitäten in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen von 0,58 auf 2,5 anstieg.

Glycogensynthase

Die Glycogensynthase lag sowohl in Kontrollen als auch in SZ-diabetischen Herzen überwiegend in der Glucose-6-P abhängigen D-Form vor. Das Verhältnis Glycogensynthase I/D fiel durch die Induktion des SZ-Diabetes von 10,2 auf 4,6 % ab, d.h. die Glycogensynthase wurde im SZ-Diabetes inaktiviert (Tab. 38).

		Kontrolle	SZ-Diabetes
GS I	(nmol/min x mg)	1,9 ± 0,1	1,05 ± 0,12
GS D	(nmol/min x mg)	17,0 ± 1,7	24,40 ± 4,40
GS D+I	(nmol/min x mg)	18,9 ± 1,8	25,40 ± 4,30
$\frac{\text{GS I}}{\text{GS D}}$	(%)	10,2 ± 0,4	4,60 ± 1,10

Tab. 38: Aktivität der Glycogensynthase in Kontroll- und SZ-diabetischen Ratten.
Herzen wurden 10 min. mit Krebs-Henseleit-Puffer (11 mmol/l Glucose) perfundiert und gefriergestoppt. Die spezifischen Aktivitäten der Glycogensynthase wurden in nmol/min x mg Protein angegeben.
$\bar{x} \pm$ SEM, n = 5, * $p < 0,05$

Während sich somit Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten nicht im myokardialen Gehalt an cyclischen Nucleotiden sowie der Adenylcyclase-Aktivitäten unterschieden, führte kurzzeitige Perfusion in SZ-diabetischen Herzen zu einem Überwiegen der jeweiligen phosphorylierten Formen der Phosphorylase und Glycogensynthase, was Aktivierung der Phosphorylase, aber Inaktivierung der Glycogensynthase bedeutet.

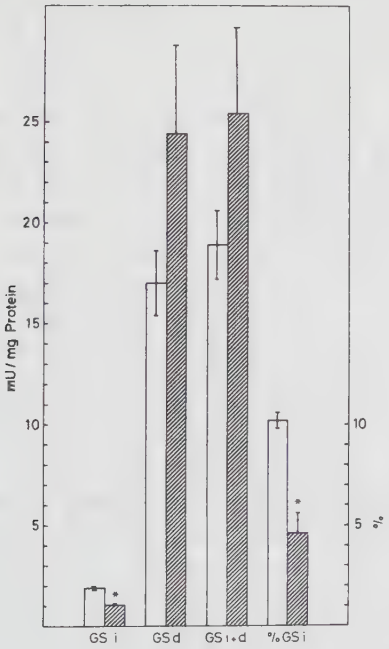


Abb. 27: Einfluß von SZ-Diabetes auf die myokardiale Glycogensynthase im isoliert-perfundierten Rattenherzen.
Experimentelle Einzelheiten siehe Tab. 38.
$\bar{x} \pm$ SEM, * $p < 0{,}05$
Kontrolle: ☐
SZ-Diabetes: ▨

Zusammenfassung der enzymatischen Untersuchungen

(a) Triacylglycerin-Hydrolase:

(1) Aus der pH-Abhängigkeit, dem Produktspektrum sowie dem Einfluß von Phosphatidylserin auf die TG-Lipase-Aktivität folgt, daß im Herzen zwei Lipase-Aktivitäten (TGL 7,4 und TGL 4,5) zu unterscheiden sind. Aus der Differentialzentrifugation ergab sich weiterhin, daß TGL 4,5 einer lysosomalen/mitochondriellen Fraktion zuzuordnen ist, während TGL 7,4 zu einem großen Teil als cytosolisches Enzym vorliegt.

(2) Die Substratabhängigkeit der TGL-Aktivitäten wurde radioaktiv mit Triolein und fluorimetrisch (4-MUO) bestimmt. Konzentrationen an Triolein > 4 mmol/l führten zur maximalen Aktivität, die K_m liegt im Bereich von 2 mmol/l.
Die maximale spezifische Aktivität von 3 nmol/min x mg Protein bedeutet bezogen auf das isoliert-perfundierte Herz einen Glycerinausstrom von ca. 3 nmol Glycerin/min x mg Protein oder 90 - 100 nmol Glycerin/min x g FG, was mit experimentellen Daten aus Perfusionsexperimenten gut übereinstimmt.

(3) TGL 4,5 spaltet Triolein nur partiell, d.h. Hauptprodukt sind Mono- und Diglyceride, während TGL 7,4 Triolein zu 85 % vollständig hydrolysiert. Da im Herzen keine Akkumulation von Mono- und Diglyceriden beobachtet wurde, folgt, daß TGL 7,4 für die Hydrolyse endogener Triglyceride in erster Linie verantwortlich sein sollte.

(4) Die TGL-Aktivitäten können von der Lipoproteinlipase-Aktivität abgegrenzt werden (Perfusion mit Heparin, Inhibition mit Protamin und NaCl). In isolierten Myocyten wurden ebenfalls TGL 4,5 und 7,4 nachgewiesen.

(5) SZ-Diabetes als auch „chronischer Diabetes" führten bei nichtperfundierten Herzen zur Reduktion der spezifischen TGL-Aktivitäten, die partiell durch Insulintherapie reversibel ist.

(6) Hinweise auf eine direkte Aktivierung der TGL über einen c-AMP-abhängigen Mechanismus ergaben sich nicht.

(7) Die TGL-Aktivitäten sind ebenso wie die myokardiale Lipolyse durch Produkte der Lipolyse und des Fettsäurestoffwechsels hemmbar (Carnitinderivate, Fettsäuren, Mono- und Diglyceride).

(b) Adenylcyclase und cyclische Nucleotide:

(1) Die spezifische Aktivität der Adenylcyclase betrug in Kontrollherzen 69 ± pmol/min x mg Protein; SZ-Diabetes hatte keinen signifikanten Einfluß auf die myokardiale Adenylcyclase-Aktivität.

(2) Der myokardiale c-AMP-Gehalt lag bei 475 pmol/g FG, c-GMP bei 59 ± 6. Im SZ-Diabetes war eine Tendenz zur Erhöhung des c-AMP- und zur Verminderung des c-GMP-Gehaltes festzustellen.

(c) Glycogenphosphorylase:

(1) In nicht-perfundierten Kontrollherzen betrug das Verhältnis Phosphorylase a/Phosphorylase a+b 13 %, im SZ-Diabetes 7 %, bei einer Gesamtaktivität von 160 - 180 nmol/min x g FG.

(2) Perfusion (10 min.) führte zur Aktivierung der Phosphorylase in Kontrollen und SZ-diabetischen Rattenherzen:
Kontrollen 20,8 % Phosphorylase a/Gesamtphosphorylase
SZ-Diabetes 51,0 % Phosphorylase a/Gesamtphosphorylase.
Im SZ-Diabetes kam es demnach zu einer überproportionalen Aktivierung der Phosphorylase im Vergleich zur Kontrolle.

(d) Glycogensynthase:

(1) SZ-Diabetes bedingte eine Verringerung des Anteils der Glycogensynthase I an der Gesamtaktivität:

Kontrolle 10,2 % GS I/Gesamtaktivität
SZ-Diabetes 4,6 % GS I/Gesamtaktivität.

(2) Die spezifischen Aktivitäten GS I und D sowie Gesamtaktivitäten der Glycogensynthase sind im SZ-Diabetes und Kontrollen nicht verschieden.

D DISKUSSION

1. Der experimentelle Diabetes

Applikation von 90 - 100 mg SZ/kg KG unter Standardbedingungen führte innerhalb von 72 Stunden bei Ratten zur Entwicklung eines experimentellen Diabetes mit folgenden Symptomen: Hyperglykämie, Glucosurie, Insulinmangel, Ketoazidose, Gewichtsverlust.
Die hohe Dosis von 90 - 100 mg SZ/kg liegt zwar nur wenig unterhalb der LD_{50} von 137 mg SZ/kg (Rakieten, 1963), war aber zur Erzeugung eines ketoazidotischen Diabetes (SZ-Diabetes-Modell Typ I Diabetes) erforderlich. Da die nach Applikation von SZ überlebenden ß-Zellen erst nach 48 Stunden degranuliert (Brosky und Logothetopoulos, 1969) und die Insulinplasmaspiegel maximal erniedrigt sind, wurden experimentelle Untersuchungen frühestens drei Tage nach SZ-Injektion begonnen. Auch bei niedriger Dosis (60 mg SZ/kg) entwickelte sich ein experimenteller Diabetes, gekennzeichnet durch Hyperglykämie, Glucosurie und Insulinmangel („chronischer Diabetes"), aber ohne Anzeichen einer Ketoazidose; eine Regeneration der ß-Zellen ist auch bei vierwöchiger oder längerer Versuchsdauer auszuschließen (Junod et al., 1969, Steiner et al., 1970).

Im Gegensatz zum Insulinmangel nach forcierter Fütterung von Glucose, der Verabreichung von Insulinantikörpern oder Langzeitbehandlung mit Cortisol und/oder Glucagon stellt der SZ-Diabetes demnach eine Form des permanenten Insulinmangel-Diabetes dar (Usadel et al., 1975). Während die ß-toxische Wirkung von SZ als gesichert gelten kann (Rerup, 1970), ist ähnlich wie beim Alloxan der Wirkungsmechanismus von SZ nicht eindeutig geklärt. Vermutet wird eine Beeinflussung des Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Stoffwechsels (Schein u. Bates, 1968, Stauffacher et al., 1970, Frerichs u. Creutzfeld, 1971). Nach neueren Untersuchungen sind auch Autoimmunmechanismen an der Ausprägung des SZ-Diabetes beteiligt (Kiesel et al., 1981).

Die klinisch-chemischen Befunde nach SZ-Applikation stimmen weitgehend mit Literaturdaten überein (Rudas, 1972, Davis, 1979, Nosadini et al., 1979, Schmidt et al., 1980, Rancour u. Wells, 1980) und belegen, daß die Auswahlkriterien für beide Formen des experimentellen Diabetes erfüllt waren.
Der Anstieg der Plasmafettsäuren und -triglyceride ist somit als Ausdruck des akuten Insulinmangels und Glucagonüberschusses aufzufassen (Katsilambros et al., 1970) und stellt gleichzeitig eine Voraussetzung für die im SZ-Diabetes erhöhte Ketonkörperproduktion (Axelrod et al., 1979) dar. Während bei einer Dosis von 60 mgSZ/kg auch Langzeitstudien mit permanentem Diabetes möglich sind, in deren Verlauf sich diabetestypische Veränderungen der Gefäße entwickeln (Rodriguez, 1951, Chlaralampros, 1950, Sallmann, 1971, Rudas, 1972, Fox et al., 1977, Rasch, 1979) führten hohe Dosen von SZ als Folge der Ketoazidose zur Urämie (Hohenegger u. Rudas, 1971 a,b).

Da der Metabolismus im isoliert-perfundierten Herzen nicht nur vom aktuellen Substratangebot im Perfusionsmedium abhängig ist, sondern vorausgehende Stoffwechselzustände nachwirken können, erschien es notwendig, die Ausgangslage des myokardialen Stoffwechsels unmittelbar vor Perfusionsbeginn zu charakterisieren.
Im nicht-perfundierten, gefriergestoppten Herzen SZ-diabetischer Ratten wurde eine Akkumulation von Glycogen und Triglyceriden sowie ein Anstieg der stationären Konzentrationen von Glucose-6-P und Citrat und des Glucose-6-P/Fructose-1,6-biphosphat-Verhältnisses im Vergleich zu stoffwechselgesunden Kontrolltieren beobachtet (Kap. C 1). Ähnliche Befunde wurden auch nach einmaliger Applikation von Alloxan erhoben (Shipp et al., 1961, Randle et al., 1963, Garland u. Randle, 1964, Opie et al., 1979).

Die PDH lag im SZ-Diabetes weitgehend in ihrer inaktiven Form, der PDH_a vor. Eine ähnliche Verminderung des PDH_a-Anteils an der Gesamtaktivität im Vergleich zur Kontrolle wurde auch im Alloxan-Diabetes und nach Applikation von Insulinantikörpern kurz vor Versuchsbeginn beobachtet (Randle et al., 1964, Garland u. Randle, 1964, Wieland et

al., 1971, Chain et al., 1979). Allerdings war der enzymatisch bestimmte Anteil der PDH_a an der Gesamtaktivität (%) sowohl in Kontrollen als auch im SZ-diabetischen Herzen größer, als aus Untersuchungen an perfundierten Herzen folgte (C 2 d). Es kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß es bei Aufarbeitung des Gewebes für die enzymatische Messung zu einer partiellen Reaktivierung der PDH in beiden experimentellen Gruppen kam. Klinisch-chemische Parameter, aber auch die genannten Stoffwechselparameter des nicht-perfundierten Herzens weisen somit daraufhin, daß SZ-Applikation vergleichbare Auswirkungen auf den metabolischen Zustand des Herzens wie Alloxan (Randle et al., 1963, 1964, 1966, Neely u. Morgan, 1974) hat und beide Modelle von vergleichbaren Ausgangsbedingungen ausgehen.

Im Sinne des Glucose-Fettsäure-Zyklus (Randle et al., 1963) können die metabolischen Auswirkungen der akuten, ketoazidotischen diabetischen Stoffwechsellage, wie sie für das nicht-perfundierte Herz angedeutet wurden, als Folge der im Insulinmangel beschleunigten Lipolyse im Fettgewebe angesehen werden. Dieser Hypothese folgend, sind Fettsäuren bevorzugtes Substrat des myokardialen Stoffwechsels und unterliegen einer raschen ß-Oxidation. Das vermehrt anfallende Acetyl-CoA soll einerseits eine Hemmung der PDH (Randle et al., 1964, 1966, Wieland et al., 1969, 1971, Kerbey et al., 1976) bedingen, andererseits aber über eine vermehrte Citratsynthese zur Hemmung der Phosphofructokinase führen bzw. deren Hemmung durch ATP (Parmeggioani et al., 1963, Passonneau et al., 1963, Garland u. Randle, 1964, Randle et al., 1966) verstärken. Als Folge beider Mechanismen wäre die beobachtete Hemmung der Glycolyse zu erwarten, die durch Inhibition der Hexokinase durch akkumulierendes Glucose-6-P (England u. Randle, 1967) noch verstärkt würde (vgl. S. 117 - 118). Die Aktivierung der Glycogensynthase D durch Glucose-6-P (Rosell-Perez et al., 1962, Larner et al., 1974) könnte weiterhin die Akkumulation von Glycogen im Herzen unter den experimentell-diabetischen Bedingungen erklären.

Wenn die beobachtete Hemmung des Glucoseumsatzes tatsächlich im Sinne

des Glucose-Fettsäure-Zyklus lediglich eine Folge des hohen Plasmafettsäureangebotes darstellt, sollte im in vitro mit Glucose als einzigem Substrat perfundiertem Herzen eine weitgehende Normalisierung des im SZ-Diabetes gestörten Glucosestoffwechsels erfolgen. Das isolierte, Glucose-perfundierte Herz stellt somit ein Modell dar,

(a) um zu prüfen, ob die genannten metabolischen Veränderungen des Glucosestoffwechsels im diabetischen Herzen Ausdruck eines im Insulinmangel veränderten Substratangebotes darstellen und durch Perfusion mit Glucose und Insulin in vitro reversibel sind oder eine Insulinresistenz vorliegt, und

(b) um gegebenenfalls die Art und Ursachen der Insulinresistenz zu charakterisieren.

Wendet man die von Skyler (1979) vorgeschlagene Zuordnung der Insulinresistenz zum Insulinrezeptor an, so müßten Defekte im Glucosestoffwechsel, die auf Grund eines forcierten Lipidstoffwechsels bedingt sind, als Post-Insulinrezeptor-Defekte im Sinne eines gestörten Insulinsignal-Transfers klassifiziert werden.

2. Glucosestoffwechsel im isoliert-perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten

Aus meßtechnischen Gründen stellen Lactat und Pyruvat die ersten im offenen Perfusionssystem erfaßbaren Metabolite des Glucoseumsatzes dar.

Lactat- und Pyruvatproduktion:

Während bei Kontrollherzen der Pyruvat-Efflux während der Perfusionszeit abnahm und der Lactatausstrom einen steady state erreichte, stieg bei Perfusion SZ-diabetischer Rattenherzen das in das venöse Effluat abgegebene Lactat und Pyruvat mit zunehmender Perfusionszeit an, so daß nach 45-minütiger Perfusion die Lactat- und Pyruvatproduktion SZ-diabetischer Herzen die Kontrollwerte 4 - 5-fach übertraf. Auf Grund

des hohen Lactat- und Pyruvatausstromes war auch in Gegenwart von Insulin der glycolytische Umsatz von Glucose in SZ-diabetischen Herzen nur wenig geringer als in Kontrollherzen. Deutlich verschieden waren allerdings die Anteile an glycolytisch gebildetem Pyruvat, die oxidiert und damit über die PDH in den Citrat-Zyklus eingeschleust wurden und damit auch die aus der Glucoseutilisation in Form von ATP gewonnene Energie.

Während der Ausstrom von Pyruvat und Lactat von glucoseperfundierten Kontrollherzen mit Literaturwerten übereinstimmt (Mowbray u. Ottaway, 1973), stehen die in der vorliegenden Untersuchung beschriebene, hohe Produktion von Lactat und Pyruvat, die beschleunigte Glycolyse sowie die Akkumulation von Lactat und Pyruvat im SZ-diabetischen Herzen in Widerspruch zu experimentellen Befunden an alloxandiabetischen Herzen, in denen zwar auch Pyruvat im Vergleich zur Kontrolle vermehrt gebildet wurde, die Glycolyse jedoch nahezu vollständig blockiert war (Garland u. Randle, 1964, Randle et al., 1964, 1966, Neely u. Morgan, 1974).
Daß die Akkumulation von Lactat und Pyruvat im Herzen SZ-diabetischer Ratten nicht auf eine limitierende Aktivität der Lactatdehydrogenase zurückzuführen ist, folgt aus den wesentlich höheren Effluxen von Lactat, die bereits für das isoliert-perfundierte Rattenherz in Abhänigkeit von den experimentellen Bedingungen beschrieben wurden (Garland et al., 1962, Newsholme u. Start, 1977, Steenbergen et al., 1978).

Es ist daher anzunehmen, daß die Unterschiede im Pyruvat- und Lactatausstrom bei diabetischen Herzen mit dem in der vorliegenden Untersuchung verwendeten offenen Perfusionssystem in engem Zusammenhang stehen, das eine Reutilisation und Akkumulation von Stoffwechselprodukten im Perfusionsmedium verhindert, eine Schlußfolgerung, die durch folgende Beobachtung nahegelegt wird:
Untersuchungen von Mowbray u. Ottoway (1973 a, b) zeigten, daß bereits nach 30-minütiger rezirkulierender Perfusion von Kontrollherzen mit Glu-

cose eine stationäre Lactatkonzentration von 1 - 2 mmol/l im Perfusionsmedium vorliegt, d.h. Perfusion von Herzen mit Glucose in einem rezirkulierenden Perfusionssystem führt zur Akkumulation von Lactat und Pyruvat im Perfusionsmedium. Da Pyruvat und Lactat im Vergleich zu Glucose vom Herzen bevorzugt metabolisiert werden und die Glycolyse hemmen (Newsholme et al., 1962, Randle et al., 1964) sowie ferner unter SZ-diabetischen Bedingungen eine stärkere Akkumulation von Pyruvat und Lactat im Perfusionsmedium als in Kontrollen zu erwarten ist (C 2), ist eine Interferenz von Lactat und Pyruvat mit der Glycolyse in einem rezirkulierenden Perfusionssystem wahrscheinlich.

Der Lactat- und Pyruvatausstrom war bei Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen von der Konzentration an exogener Glucose abhängig: Insulin beschleunigte in Kontrollherzen die Lactat- und Pyruvatproduktion, hatte jedoch in SZ-diabetischen Rattenherzen nur geringen Einfluß. Die im Vergleich zur Pyruvatoxidation hohe Beschleunigung der Glycolyse durch Insulin in Kontrollherzen deutet im Zusammenhang mit der Tatsache, daß in Gegenwart von Insulin durch Kontrollen nahezu ausschließlich exogene Glucose umgesetzt wurde, daraufhin, daß die Insulinwirkung im wesentlichen auf eine erleichterte Aufnahme von Glucose durch das Herz zurückzuführen ist (Morgan et al., 1959, 1961, 1964, Morgan u. Neely, 1972). Im SZ-diabetischen Herzen war der basale glycolytische Umsatz von Glucose trotz der hohen Lactat- und Pyruvatproduktion geringer als in Kontrollherzen. Insulin bedingte zwar eine Beschleunigung der Glycolyse; der maximale glycolytische Umsatz von Glucose blieb aber deutlich geringer als in Kontrollherzen.

Zusammen mit dem Befund, daß in SZ-diabetischen Herzen das Verhältnis des Umsatzes von exogener Glucose zu Glycogen-Glucose insulinunabhängig war - auch mit Insulin entstammten 30 - 40 % der umgesetzten Glucose aus den myokardialen Glycogenreserven, so daß im SZ-Diabetes ein Netto-Glycogenverlust auftrat - , weisen diese Beobachtungen daraufhin, daß

die Glucoseaufnahme im SZ-Diabetes limitiert ist und dadurch der glycolytische Umsatz begrenzt wird. In Übereinstimmung hiermit wurde eine Hemmung der Glucoseaufnahme im alloxandiabetischen Herzen direkt nachgewiesen (Morgan et al., 1961, 1964, Randle et al., 1963, 1964, Newsholme u. Randle, 1964).

Eine Hemmung der Phosphorylierung von Glucose auf der Ebene der Phosphofructokinase und davon abhängig der Hexokinase kann bei hyperlipämischen Zuständen in vivo und auch beim Fettsäure- und ß-Hydroxybutyrat-perfundierten Herzen (Randle et al., 1964, Newsholme u. Randle, 1964, Regen et al., 1964, Neely et al., 1969, Hron et al., 1978, Rösen et al. unveröffentlicht) als gesichert gelten und spielt vermutlich auch beim rezirkulierend perfundierten alloxandiabetischen Rattenherz eine Rolle (Morgan et al., 1961, Randle et al, 1964, Newsholme u. Start, 1977). Diese Zustände sind gekennzeichnet durch Akkumulation von freier Glucose im Myokardium (Randle et al., 1963, Garland u. Randle, 1964, Morgan et al., 1961), durch Glucose-6-P/Fructose-1,6-bisphosphat Quotienten > 50 und einen myokardialen Citratgehalt > 700 nmol/g FG. Unter den in den vorliegenden Untersuchungen gewählten experimentellen Bedingungen - Perfusion mit Glucose als einzigem Substrat im offenen Perfusionssystem - spielt die in vivo beobachtete Hemmung der Phosphorylierung von Glucose im SZ-Diabetes eine untergeordnete Rolle. Darauf weisen das Glucose-6-P/Fructose-1,6-biphosphat-Verhältnis, das bei Perfusion der Herzen mit Glucose von 87 auf 9 abfiel, sowie der myokardiale Gehalt an Glucose-6-P und Citrat hin, der sich nicht signifikant von Kontrollwerten (Glucose + Insulin) unterschied. Zudem war die Produktion von Lactat und Pyruvat in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen unter basalen Bedingungen nicht signifikant verschieden.

Eine gleichmäßige Verteilung von Citrat zwischen cytosolischem und mitochondriellem Kompartiment vorausgesetzt, errechnet sich die Citratkonzentration im perfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten zu etwa 0,6 - 0,7 mmol/l (+ Insulin), eine Konzentration an Citrat, die noch nicht hemmend auf die Phosphofructokinase wirkt

(Parmeggiani et al., 1963, Passonneau et al., 1963), während in vivo die Citratkonzentration von Kontrollen 1,6 und im SZ-Diabetes sogar 2,3 mmol/l betrug.
Perfusionsexperimente mit ß-Hydroxybutyrat, der Vergleich des Citratgehaltes in nicht-perfundierten und perfundierten Herzen sowie die Tatsache, daß keine Korrelation zwischen myokardialem Citrat und Glycolyse besteht, lassen vermuten, daß eine Schwellenkonzentration an Citrat von 700 - 800 nmol/g FG erreicht sein muß, um die Phosphofructokinase zu hemmen. Durch Perfusion und den hierdurch bedingten Auswascheffekt fiele die intrakardiale Citratkonzentration unter diesen Schwellenwert, vermutlich weil im glucoseperfundierten diabetischen Herz eine verminderte Acetyl-CoA-Produktion die Citratsynthese limitiert.
Die Frage der Beteiligung von cytosolischem Citrat an der Regulation der Phosphofructokinase (Garland et al., 1963, Regen et al., 1964) bleibt allerdings offen, solange die cytosolische Konzentration des Citrates nicht bekannt ist. Es wurde zwar ein Carrier für Citrat nachgewiesen (Williamson, 1979), seine Aktivität sowie das Verhältnis zwischen cytosolischem und mitochondriellem Citrat sind aber unbekannt. Auch die Verringerung des ATP-Gehaltes bei erhöhtem myokardialem AMP stehen in Einklang mit einer Aktivierung der Phosphofructokinase im glucoseperfundierten SZ-diabetischen Rattenherzen. Der myokardiale Gehalt an AMP nahm im Vergleich zur Kontrolle unter diabetischen Bedingungen zu (+ 34,9 %). Inwieweit diese Veränderungen des myokardialen AMP und Citrates tatsächlich eine Rolle für die Regulation der Phosphofructokinase spielen, setzt die Kenntnis der Funktion und Synthese des Fructose-2,6-biphosphates voraus, das neuerdings als Hauptregulator der Phosphofructokinase diskutiert wird (van Schaftingen u. Hers, 1980, Clark et al., 1982).

Pyruvatoxidation:

Im Gegensatz zur Glycolysegeschwindigkeit blieb die Pyruvatoxidation ähnlich wie in alloxandiabetischen Rattenherzen (Randle et al., 1963, 1966) im SZ-diabetischen Herz minimal. Aus enzymatischen Untersuchungen,

aber auch aus der Berechnung der PDH-Aktivität im isoliert-perfundierten Herzen folgt, daß auch im glucoseperfundierten SZ-diabetischen Rattenherzen der Anteil der aktiven Form des PDH-Komplexes niedrig ist ($PDH_a/PDH_{a+b} < 10$ %) und Perfusion keinen Einfluß auf die Aktivität des PDH-Komplexes im SZ-Diabetes hatte. Eine ähnliche Inaktivierung des PDH-Komplexes wurde auch für alloxandiabetische Rattenherzen beschrieben (Garland et al., 1962, 1964, Wieland, 1969, 1971, Ohlen et al., 1978). Insulin bedingte in Kontrollherzen eine Verdoppelung der Pyruvatoxidation, die sich aber nur in einer geringen Erhöhung des Anteils der PDH_a an der Gesamtaktivität äußerte (PDH_a/PDH_{a+b} 25 bzw. 20 %) und somit weniger auf eine direkte Beeinflussung des PDH_a/Gesamt-PDH durch Insulin hinweist, als vielmehr vermuten läßt, daß der durch Insulin gesteigerte Substratfluß einen höheren Umsatz durch die PDH ermöglicht.
In Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen an alloxandiabetischen Rattenherzen (Garland, 1962, 1964, Kerbey et al., 1976, Neely u. Morgan, 1974, Ohlen et al., 1978) hatte Insulin in SZ-diabetischen Rattenherzen weder Einfluß auf die Pyruvatoxidation noch den Aktivitätszustand der PDH. Es ist daher anzunehmen, daß die PDH im SZ-diabetischen Rattenherzen auf Grund des gesteigerten Metabolismus endogener Lipide einer Produkthemmung durch Acetyl-CoA unterliegt. Diese Interpretation würde auch erklären, daß die Vergrößerung der myokardialen Arbeitsleistung keinen Einfluß auf die Glucoseoxidation im SZ-diabetischen Rattenherzen hatte (C 2 e).

Perfusion von SZ-diabetischen Herzen mit Glucose führte demnach zu einer partiellen „Normalisierung" des Glucosestoffwechsels, jedoch blieben die Aktivität der Pyruvatoxidation niedrig und der maximale Glycolysefluß vermindert, vermutlich weil die Aufnahme von exogener Glucose durch die Herzzelle limitiert ist. Insulin hatte im SZ-diabetischen Herzen zwar Einfluß auf die Lactat- und Pyruvatproduktion, nicht aber auf die Pyruvatoxidation und die Glycogensynthese.

Folgt man der Einteilung der Insulinresistenz von Kahn (1978)

1. verminderte Sensitivität des Insulinrezeptors bei maximaler biologischer Antwort (Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve),
2. verminderte biologische Antwort bei unveränderter Sensitivität des Insulinrezeptors (Maximum der Dosiswirkungskure erniedrigt),
3. verminderte Sensitivität des Insulinrezeptors bei gleichzeitig verringerter biologischer Antwort (Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve mit erniedrigtem Maximum),

so wäre das isoliert-perfundierte Herz SZ-diabetischer Ratten durch den dritten Zustand gekennzeichnet; selbst sehr hohe Dosen an Insulin rufen keine (Glucoseoxidation und Glycogensynthese) bzw. verminderte (Lactat- und Pyruvatproduktion) biologische Antwort hervor.

Da Präinsulinrezeptordefekte etwa durch Insulinantikörper oder Insulinantagonisten im isoliert-perfundierten Herzen auf Grund der Auswaschphase vor Beginn der Perfusionsexperimente für die Störung des Glucosestoffwechsels wenig wahrscheinlich sind, müssen als Ursachen der beschriebenen Insulinresistenz Insulinrezeptor- bzw. Postinsulinrezeptordefekte angenommen werden.

3. Wechselwirkung zwischen Lipolyse und Glucosestoffwechsel im SZ-diabetischen Herzen

Wenn durch Lipolyse endogener Triglyceride gebildete Fettsäuren im glucoseperfundierten SZ-diabetischen Rattenherz zum Hauptenergieträger wurden, wie aus der Lipolyse und der Energiebilanz (Kap. C 2 d) folgte, lag es nahe zu vermuten, daß im glucoseperfundierten SZ-diabetischen Herzen die partielle Hemmung des Glucosestoffwechsels sowie die Insulinresistenz auf Grund der Oxidation von Fettsäuren, die durch Lipolyse endogener Triglyceride gebildet werden, verursacht ist und die „Umschaltung" auf Glucose als Hauptsubstrat inhibiert wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden der Glucosestoffwechsel des SZ-diabetischen Herzens nach Erschöpfung der myokardialen Triglyceride und bei Hemmung des Transportes von Fettsäuren in die Mitochondrien untersucht.

Nach Erschöpfung der endogenen Triglyceride unterschieden sich SZ-diabetische Herzen nicht länger in der Glycolysegeschwindigkeit, der Glucoseoxidation, der PDH-Aktivität sowie den stationären Konzentrationen von Glucose-6-P und Citrat von Kontrollen.

POCA, eine antiketogenetisch und hypoglykämisch wirkende Substanz (Eistetter u. Wolf, 1982, Wolf et al., 1982), erwies sich als effektiver Inhibitor der Lipolyse. Es wird vermutet, daß POCA als Carbonsäurederivat wie eine Fettsäure aktiviert wird, als Carnitinderivat kovalent an die Carnitinpalmitoyltransferase 1 bindet (Wolf, persönliche Mitteilung) und damit zur Hemmung der Carnitinpalmitoyltransferase führt. Die als Folge der POCA-Applikation - insbesondere bei Einsatz über 45 Minuten - in Gegenwart von Insulin beobachtete Beschleunigung der Glycolyse, der Pyruvatoxidation, der PDH-Aktivität sowie die Veränderungen der stationären Konzentrationen der untersuchten myokardialen Metabolite lassen sich wie die Ergebnisse der 160-minütigen Perfusion als metabolische Folge der Hemmung der Oxidation von Fettsäuren verstehen, die aus endogenen Triglyceriden lipolytisch ge-

bildet wurden. Ein direkter Einfluß von POCA auf die enzymatische Aktivität der Triacylglycerin-Hydrolase und der PDH konnte ausgeschlossen werden.

Im Unterschied zur 160-minütigen Perfusion stammte bei Perfusion SZ-diabetischer Herzen mit POCA die oxidierte Glucose allerdings nicht ausschließlich aus exogener Glucose, sondern zu 30 % aus Glycogen-Glucose, was sich in der deutlichen Abnahme des myokardialen Glycogens im Vergleich zur Kontrolle, aber auch zu perfundierten SZ-diabetischen Herzen (ohne POCA) zeigte.

Kontrollversuche mit 2-Bromoctansäure, einem Inhibitor der ß-Oxidation (Chase u. Tubbs, 1972, Burges et al., 1969) sowie die direkte Aktivierung der PDH durch Dichloracetat (DCA), McAllister et al., 1973) unterstützten den Schluß, daß Oxidation von endogenen Fettsäuren für das Fortbestehen der Inhibition der Glucoseoxidation verantwortlich ist. Die Aktivierung der PDH mit DCA erhöhte zwar den Anteil des glycolytisch gebildeten Pyruvates, der durch die PDH oxidiert wurde, die Umsatzraten blieben jedoch trotz der Aktivierung der PDH niedrig.

Aus diesen Untersuchungen folgt unmittelbar, daß die im SZ-diabetischen Rattenherzen beobachete Hemmung der Glucoseoxidation (PDH) und Glycolyse (Hexokinase und Phosphofructokinase) in vitro reversibel ist und im isolierten, glucoseperfundierten Herzen Ausdruck der Lipolyse und Oxidation endogener Lipide darstellt.
Die Verminderung der stationären Konzentrationen an Glucose-6-P und Citrat bei Perfusion mit Glucose erklärt sich offensichtlich daraus, daß die unter ketoazidotischen Bedingungen überschießende Acetyl-CoA-Produktion bei Perfusion der Herzen mit Glucose auf die Kapazität des Citrat-Zyklus reduziert wird, da die Aufnahme der durch Lipolyse endogener Triglyceride entstandenen vorwiegend langkettigen Fettsäuren im Gegensatz zu Ketonkörpern durch die Aktivität der CPT I limitiert ist (Norum, 1973, Williamson, 1979).

Dieser Zusammenhang würde auch erklären, daß die Pyruvatdehydrogenase im glucoseperfundierten Herzen in ihrer Aktivität weiterhin durch das aus der ß-Oxidation entstehende Acetyl-CoA inhibiert wird. Eine Regulation der PDH über Adeninnucleotide und NADH scheint im SZ-diabetischen Herzen - wie bereits angedeutet - nicht für die Inaktivierung der PDH verantwortlich zu sein, da die Veränderungen beider Coenzyme eher eine Aktivierung bedingen würden (Hansford, 1976, 1977, Portenhauser, 1974, Ohlen et al., 1978, Denton et al., 1978). Der unter POCA beobachtete hohe Glycolysefluß von 2,6 µmol/min x g FG, der typischerweise nur im arbeitenden Herzen auftritt, während für das Langendorff-Präparat ein Glycolysefluß von 500 nmol/min x g FG charakteristisch ist (Opie et al., 1971, Regen et al., 1964), weist zudem daraufhin, daß auch die Glucoseaufnahme im SZ-diabetischen Herzen durch den Metabolismus endogener Lipide limitiert wurde.

Da Perfusion mit POCA die Insulinsensitivität SZ-diabetischer Herzen normalisiert und eine maximale Beschleunigung der Lactatproduktion und der Glucoseoxidation durch physiologische Konzentrationen an Insulin erreicht wurden, ergibt sich aus den vorliegenden Daten, daß die Insulinresistenz der Glucoseaufnahme und -oxidation im Langendorff-Herz eine Folge des Metabolismus endogener Lipide und somit einen Postinsulinrezeptordefekt darstellt, der durch Reduktion der Fettsäureoxidation behoben werden kann. Es bleibt zu untersuchen, ob Fettsäuren oder ihre Carnitinderivate direkt mit dem Glucosecarrier oder dem Insulinrezeptor in Wechselwirkung treten oder ob die Hemmung des Glucoseumsatzes sowie seiner Insulinsensitivität indirekt erfolgt. Eine Modifizierung der Insulinrezeptorzahl durch die in den Perfusionsexperimenten teilweise verwendeten hohen Konzentrationen an Insulin im Sinne einer „down regulation" (Kahn, 1978), ist auf Grund der kurzen Perfusionsdauer (45 Minuten) auszuschließen. Zudem wird durch die Hemmung des Fettsäuretransportes in die Mitochondrien bereits mit physiologischen Konzentrationen an Insulin eine deutliche biologische Antwort des Herzens erreicht (S. 87).

Zusätzlich zu dem diskutierten Postinsulinrezeptordefekt kann eine Veränderung der Anzahl und der Affinität der Insulinrezeptoren, wie sie für den SZ-diabetischen Herzmuskel kürzlich beschrieben wurde (Borner et al., 1982, Meuli u. Froesch, 1976), zu der Störung des Glucosestoffwechsels beitragen. Wie die Versuche mit dem Carnitinpalmitoyltransferase 1-Hemmstoff POCA zeigen, scheinen derartige Rezeptordefekte für den myokardialen Glucoseumsatz jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein.

4. Glycogen-Homoöstase

Auf Veränderungen im Gleichgewicht zwischen Glycogensynthese und Glycogenolyse im SZ-diabetischen Herzen, die sowohl Ausdruck der Aktivität bzw. Aktivierung der Glycogensynthase als auch der Phosphorylase sein können, wurde bereits hingewiesen. Da im Gegensatz zum Glucoseumsatz weder die Erschöpfung der endogenen Triglyceride durch Langzeitperfusion noch die Hemmung der Carnitinpalmitoyltransferase 1 die Glycogensynthese beeinflußten, muß für die Insulinresistenz der Glycogensynthase ein anderer als der bereits diskutierte lipidstoffwechselabhängige Postinsulinrezeptordefekt verantwortlich sein.

Glycogensynthase

Während Insulin in Kontrollherzen die Glycogensynthese rasch aktiviert (Adolfson et al., 1972, Nuttall et al., 1976), was auch durch den Einbau von radioaktiver Glucose in das myokardiale Glycogen belegt wird (C 2), ist die Glycogensynthese im SZ-diabetischen Herzen insulinresistent in dem Sinne, daß selbst hohe Konzentrationen an Insulin nur eine geringe biologische Antwort hervorrufen (C 2, Chain et al., 1969).

Da die Glycogensynthese im SZ-diabetischen Herzen auch bei durch Inhibition der Fettsäureoxidation normalisierter Insulinsensitivität

- bezüglich der Lactatproduktion und Glucoseoxidation - vermindert blieb, scheidet ein Mangel an intrazellulärer Glucose oder eine Interferenz mit Produkten des Lipidstoffwechsels als Ursache der geringen Glycogensynthese aus. Es ist zwar bekannt, daß die Glucosyltransferase-D-Phosphatase durch Glycogen gehemmt wird und im Skelettmuskel eine inverse Beziehung zwischen Glycogengehalt und Glycogensynthase I besteht (Danforth, 1965); dies kann jedoch die Insulinresistenz der Glycogensynthase im SZ-diabetischen Herzen nicht erklären, da die Glycogensynthase nach Insulintherapie in vivo auch bei hohem myokardialem Glycogen insulinsensitiv wird.

Da keine diabetesbedingten Veränderungen der myokardialen cyclischen Nucleotide (C 5) sowie der Proteinkinasen (Miller, 1978) nachgewiesen werden konnten und Insulin die Glycogensynthase auch im Muskel von I-Mäusen aktivierte, die keine Phosphorylase-(Glycogensynthase)kinase aufweisen (Le Marchand-Brustel et al., 1979), ist anzunehmen, daß die Regulation der Glycogensynthase durch die Glycogensynthase-Phosphatase im Diabetes gestört ist. Eine Verminderung der Glycogensynthase-Phosphatase wurde in alloxandiabetischen Herzen nachgewiesen (Miller, 1978); allerdings wurde keine Veränderung der Glycogensynthase-Phosphatase bei Perfusion von Kontrollherzen mit Insulin beobachtet (Miller et al., 1982), obwohl die Glycogensynthase insulinabhängig aktiviert wurde (Nuttall et al., 1976, Miller, 1978).

Insulinmangel hat somit zwei Folgen: einerseits eine Verminderung der Glycogensynthase-Phosphatase im diabetischen Herzen, die nur durch Insulintherapie in vivo behoben werden kann und eine Proteinsynthese erfordert (Miller, 1978), andererseits aber einen Defekt im insulinabhängigen, akuten Aktivierungsmechanismus der Glycogensynthase.

Einer Hypothese von Cohen (1981) folgend aktiviert Insulin die Dephosphorylierung des Inhibitor-1-proteins. Als Folge kommt es zu einer Aktivierung des Inhibitor-1-proteins und damit zur Enthemmung der Proteinphosphatase 1. Insulinmangel würde somit umgekehrt über den phosphorylierten Inhibitor 1 - seine aktive Form - eine verminderte

Phosphatase-Aktivität und damit eine Inaktivierung der Glycogensynthase bedingen. Eine dieser Hypothese entsprechende insulinabhängige Dephosphorylierung des Inhibitor-1-proteins konnte kürzlich in Untersuchungen an isoliert-perfundierten Hinterkörpern nachgewiesen werden (Foulkes et al., 1980). Weitere Untersuchungen sind aber notwendig, um die angedeutete Hypothese zu überprüfen.

Die trotz der defekten Regulation der Glycogensynthase beobachtete Akkumulation von Glycogen im SZ-diabetischen Herzen erklärt sich als Folge der Aktivierung der Glycogensynthase durch den intrazellulären Anstau von Glucose-6-P, der zur Vergrößerung der V_{max} der Glycogensynthase D führt (Rosell-Perez et al., 1962, Villar-Pilasi, 1969, Gilboe u. Nuttall, 1972, Thomas und Nakai, 1973).

Glycogenphosphorylase:

Die Glycogenphosphorylase war zwar im nicht-perfundierten Herzen unter ketoazidotischen Bedingungen im SZ-diabetischen Herzen gegenüber Kontrollen erniedrigt, Perfusion der Herzen aktivierte die Phosphorylase im diabetischen Herzen jedoch rasch, so daß unter Perfusionsbedingungen die Glycogenhomoöstase in Richtung Glycogenolyse verschoben wurde.
Wir vermuten, daß die in vivo erniedrigte Phosphorylaseaktivität auf einer Hemmung des herzspezifischen Isoenzyms durch Glucose-6-P beruht (Rösen, Berndt, unveröffentlicht). Eine ähnliche Hemmung einer herzspezifischen Phosphorylase a durch Glucose-6-P wurde bereits am Schweineherz nachgewiesen (Vereb et al., 1978, Dombradi et al., 1979).

Die im Verlauf der Perfusion rasche Aktivierung der Phosphorylase im SZ-diabetischen Herzen kann nicht über ß-adrenerge Mechanismen bzw. einen c-AMP-Proteinkinase-abhängigen Mechanismus erklärt werden, da der myokardiale Gehalt an cyclischen Nucleotiden sowie die Adenylcyclase-Aktivität SZ-diabetischer Herzen (C 5) und auch die c-AMP-abhängige Proteinkinase (Miller, 1978) sich im Diabetes nicht von Kon-

trollen unterscheiden. Auch der Anstieg des myokardialen AMP in SZ-diabetischen Herzen kann die Aktivierung der Glycogenolyse nicht hinreichend erklären, da einerseits im SZ-Diabetes die Aktivierung der Phosphorylase b durch AMP sowohl durch Glucose-6-P als auch durch ATP kompetitiv gehemmt wird und andererseits eine Zunahme der Phosphorylase a-Aktivität an der Gesamtaktivität beobachtet wurde (C 5).

Der Mechanismus dieser perfusionsbedingten Aktivierung der Phosphorylase (C 5) wie auch der Hypersensitivität des diabetischen Herzens gegenüber Catecholaminen (Miller et al., 1981) ist bisher weitgehend unverstanden. Es wird vermutet, daß eine Ca^{++}-Aktivierung der Phosphorylase b-Kinase, wie sie für das Skelettmuskelenzym nachgewiesen wurde (Heilmeyer et al., 1970) auch für das Herz eine Rolle spielt. Veränderungen der Permeabilität der Zellmembran (Rösen u. Schrör, 1979, Rösen u. Rösen, in Vorbereitung) sowie insbesondere der Calciumaufnahme (Götzsche, 1981) des SZ-diabetischen Herzens könnten zu einer Verstärkung der Ca^{++}-Aktivierung der Phosphorylase b-Kinase führen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese berichteten Owen und Carrier (1980) über eine diabetesbedingte Zunahme der Noradrenalin stimulierten Ca^{++}-abhängigen Aktivierung der Kontraktilität von Rattenaorten.

Die hier vorgelegten Ergebnisse - Desaktivierung der Glycogensynthase, aber Aktivierung der Phosphorylase im Insulinmangel - stehen im Einklang mit der Postulierung eines für Glycogensynthase und Phosphorylase gleichermaßen zutreffenden insulinabhängigen Aktivierungsmechanismus, der sowohl die im isoliert-perfundierten Herzen verminderte Glycogensynthase als auch die vorherrschende Glycogenolyse erklären würde. Allerdings sind die experimentellen Daten zum Einfluß von Insulin und eines experimentellen Diabetes auf die Phosphorylase nicht widerspruchsfrei (Miller et al., 1981, Ingebretsen et al., 1981).

Voraussetzung für ein besseres Verständnis des Aktivierungsmechanismus ist die Reinigung und Charakterisierung der myokardialen Phosphorylase-Isoenzyme sowie ihrer diabetesbedingten Veränderungen.

5. Sauerstoffbilanz und Energetik des glucoseperfundierten SZ-diabetischen Rattenherzens

Sauerstoffbilanz:

Denton u. Randle wiesen bereits 1967 daraufhin, daß der Glycerinausstrom und damit die Lipolyse des perfundierten alloxandiabetischen Rattenherzens 10-fach gegenüber der Kontrolle erhöht ist sowie eine äquivalente Menge an Fettsäuren freigesetzt und oxidiert wird, Ergebnisse, die durch die vorliegende Arbeit für das SZ-diabetische Herz weitgehend bestätigt werden konnten (C 2).

Unter dieser Voraussetzung verbraucht das SZ-diabetische Herz 70 - 80 % der Sauerstoffaufnahme für die Oxidation von Fettsäuren trotz Perfusion mit Glucose als einzigem exogenen Substrat. In Kontrollen konnten lediglich 10 - 12 % des Sauerstoffverbrauchs der Fettsäureoxidation zugeordnet werden. Stattdessen verbrauchte das Kontrollherz 70 - 80 % des aufgenommenen Sauerstoffs für die Oxidation von Glucose.

Im insulinperfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten konnten über 90 % des myokardialen Sauerstoffverbrauchs durch die Oxidation dieser beiden Substrate - Fettsäuren und Glucose - erklärt werden.

Eine derartige Berechnung setzt allerdings - wie bereits diskutiert - voraus, daß die Reveresterung von lipolytisch gebildeten Fettsäuren keine nennenswerte Rolle spielt. Ergebnisse aus Untersuchungen von langzeitperfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten, in denen der integrale Glycerinausstrom in das kardiale Effluat größer als der Nettoumsatz an Triglyceriden ist, sowie an KCl-stillgestellten Herzen, in denen die Lipolyse parallel zur Glycogenolyse unter Adrenalin anstieg und der Sauerstoffbedarf für die Oxidation lipolytisch gebildeter Fettsäuren die tatsächliche Sauerstoffaufnahme überschritt, weisen jedoch daraufhin, daß die Messung von Glycerin nicht unter allen experimentellen Bedingungen einen tauglichen Parameter für die

Erfassung der Fettsäureoxidation darstellt (Kap. C 4). Andererseits ist eine alternative Methode, die die in vivo Markierung der endogenen Triglyceridspeicher voraussetzt (Evans et al., 1963), nur beschränkt anwendbar, da eine Perfusion mit hohen Fettsäurekonzentrationen notwendig ist sowie heterogene Lipidpools im Herzen die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Auch die Messung des CO_2/O_2-Quotienten, die Hinweise auf das Verhältnis zwischen Fettsäure- und Glucoseoxidation geben kann, erwies sich für eine quantitative Evaluierung des Anteils beider Stoffwechselwege als wenig hilfreich.

Der insbesondere in Abwesenheit von Insulin durch Glucose- und Fettsäureoxidation nicht erklärbare Sauerstoffverbrauch des Herzens kann auf die Oxidation alternativer Substrate hinweisen, die aber nicht mit dem Pyruvatpool interferieren dürfen, da dieser bestimmt und in die Berechnungen einbezogen wurde (Kap. C 2). Es ist denkbar, daß durch Proteolyse Aminosäuren für den oxidativen Stoffwechsel freigesetzt werden und damit zum Sauerstoffverbrauch beitragen.
Eine Unterschätzung der lipolytisch gebildeten Fettsäuren auf Grund einer Reutilisation von Glycerin durch den Herzmuskel, die den Sauerstoff-Fehlbedarf erklären würde, scheidet wegen der geringen myokardialen Glycerinkinaseaktivität (Wieland u. Syster, 1959, Robinson u. Newsholme, 1967) und Glycerinutilisation (Rösen und Reinauer, unveröffentlicht) aus.
Die in der Literatur vorliegenden Daten über eine Bilanzierung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs (Neely et al., 1972) lassen sich zum Vergleich nur bedingt heranziehen, da in den meisten Untersuchungen nur ein Parameter - entweder die Oxidation von Glucose oder von Fettsäuren - direkt gemessen wurde und aus der Differenz zwischen Sauerstoffaufnahme und dem experimentell ermittelten Verbrauch für Glucose bzw. Fettsäuren der Sauerstoffverbrauch des zweiten myokardialen Substrates errechnet wurde.

Citrat-Zyklus:

In Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen entstehen etwa 2/3 der Reduktionsäquivalente durch die Oxidation von Acetyl-CoA im Citrat-Zyklus, während Glycolyse sowie die Oxidation von Pyruvat nur 16 - 17 % in Kontrollen und 12 - 13 % in SZ-diabetischen Herzen zur NADH-produktion beitrugen. Die ß-Oxidation spielte nur im SZ-diabetischen Herzen eine relevante Rolle (24 % im Vergleich zu 1 - 4 % in Kontrollherzen).

Im Vergleich zu Kontrollherzen ergibt sich aus diesen Daten (Citrat-Zyklus, NADH-produktion, Sauerstoffverbrauch) kein Hinweis auf eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung im SZ-diabetischen Herzen, wie sie als Folge des Anstaus von Fettsäuren (C 1) sowie an Acylcarnitin und -CoA im Herzmuskel diskutiert wird (Shug u. Shrago, 1973, Shug et al., 1971). Die Berechnung der Produktion der Reduktionsäquivalente in perfundierten Kontrollen und SZ-diabetischen Rattenherzen unterstreicht vielmehr den diskutierten Befund, daß in SZ-diabetischen Herzen endogene Fettsäuren Hauptenergieträger sind und die Glycolyse im Gegensatz zur PDH kaum inhibiert ist.

In nicht-perfundierten Herzen von Kontrollen errechnet sich aus dem myokardialen Lactat- und Pyruvatgehalt ein cytosolisches NAD/NADH-Verhältnis von 730, das im ketoazidotischen, SZ-diabetischen Herzen wie auch in Lebergewebe (Williamson et al., 1967) erniedrigt ist. d.h. im diabetischen Herzen hält im Vergleich zur Kontrolle die Reoxidation von NADH mit seiner Bildung Schritt. Da bei Perfusion der SZ-diabetischen Herzen mit Glucose das NAD/NADH-Verhältnis rasch anstieg, den Kontrollwert sogar überstieg, in Kontrollherzen aber Perfusion mit Glucose keine Veränderung des NAD/NADH-Verhältnisses verursachte, wird vermutet, daß die Erniedrigung des NAD/NADH-Verhältnisses im SZ-Diabetes Ausdruck der ketoazidotischen Stoffwechsellage darstellt; die Plasmakonzentration an Ketonkörpern ist im SZ-Diabetes 10 - 20-fach größer als in Kontrollherzen.

	Reduktionsäquivalente (nmol H_2/min)							
	Kontrolle				SZ-Diabetes			
Insulin	-		+		-		+	
aus Glycolyse	1076	17 %	1509	17 %	756	10,3 %	1030	10,6 %
aus Pyruvatoxidation	997	16 %	1251	14,1 %	178	2,4 %	201	2,1 %
aus Citrat-Zyklus	4180	66 %	5780	65,1 %	4636	63,4 %	6136	63,0 %
aus ß-Oxidation	86,4	1,4 %	344	3,9 %	1746	23,9 %	2370	24,3 %
Gesamt	6339,4		8884		7316		9737	

Tab. 41: Bildung von Reduktionsäquivalenten (NADH + H^+ und $FADH_2$) im isoliert-perfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten.
Die Menge an Reduktionsäquivalenten wurde aus der Pyruvatoxidation, dem Glycolyseumsatz, der Fettsäureoxidation und der Oxidation des entstehenden Acetyl-CoA im Citrat-Zyklus berechnet.
Experimentelle Einzelheiten sind in Tab. 21 und 22 angegeben.

Unter ketoazidotischen Bedingungen - in vivo - ist ß-Hydroxybutyrat und nicht Acetoacetat Hauptsubstrat, so daß dem Herzen zusätzliche Reduktionsäquivalente zugeführte werden, die das Lactat/Pyruvat-Verhältnis in Richtung Lactat verschieben. Die Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes als auch des NAD/NADH-Verhältnisses unter ketoazidotischen Bedingungen sind im Diabetes von besonderer Bedeutung, da sie über eine Hemmung der Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (Mochizuki et al., 1979) zu einer zusätzlichen Limitierung der Glycolyse führen.

Der Turnover des Citrat-Zyklus - Tab. 42 - lag in Kontrollen und SZ-diabetischen Herzen bei 1100 nmol/min. in Übereinstimmung mit Literaturwerten (Neely et al., 1972). Kontrollen und SZ-diabetische Herzen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Insulin beschleunigte den Umsatz an Acetyl-CoA in Kontrollen um 38 % bzw. 32 %

in SZ-diabetischen Herzen. Aus diesen Daten folgt, daß der Turnover im Citrat-Zyklus in den beiden experimentellen Gruppen nicht verschieden ist. Das umgesetzte Acetyl-CoA stammte allerdings in Kontrollen zu 90 % aus dem Pyruvatmetabolismus, im SZ-diabetischen Herzen dagegen zu 85 - 90 % aus der ß-Oxidation. Auch diese Daten belegen eindrucksvoll die unterschiedliche Beteiligung der PDH am Metabolismus von SZ-diabetischen und stoffwechselgesunden Rattenherzen.

	Acetyl-CoA-Umsatz im Citrat-Zyklus (nmol/min)			
	Kontrolle		SZ-Diabetes	
Insulin	-	+	-	+
Pyruvatoxidation	997 95 %	1251 87 %	178 15,4 %	201 13,1 %
ß-Oxidation	48,9 4,7 %	194,4 13,5%	981 84,6 %	1333 86,9 %
Gesamt	1045	1445	1159	1534

Tab. 42: Acetyl-CoA-Produktion im isoliert-perfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten.
Die Acetyl-CoA-Produktion wurde aus der Pyruvat- und Fettsäureoxidation nach Tab. 21 und 22 berechnet.

Energiereiche Phosphate:

Die ATP-Produktion von Kontrollherzen, berechnet auf Grund der in Kap. C 2 dargestellten Ergebnisse (Tab. 43), stimmt mit Ergebnissen von Neely et al. (1972) weitgehend überein. Im Vergleich zu Kontrollen weisen SZ-diabetische wie auch alloxandiabetische Herzen (Allison et al., 1976) einen verminderten ATP-Gehalt und eine geringere ATP-Synthese auf, ohne daß sich das ATP-ADP-Verhältnis bzw. der Energiestatus

(„energy-charge", Atkinson, 1968) signifikant unterscheidet.

Die im SZ-Diabetes verminderte ATP-Synthese kann einerseits als Folge der unterschiedlichen Substrate (Glucose bzw. Fettsäuren) für den Energiestoffwechsel in SZ-diabetischen Herzen und Kontrollen verstanden werden (P/O-Quotient). Dies würde auch erklären, daß sowohl der ATP- wie auch der Creatinphosphatgehalt durch Insulin im SZ-Diabetes nicht beeinflußt wurde. Andererseits tritt aber zusätzlich ein nichtperfusionsbedingter Verlust an Adeninnucleotiden auf (Kap. C 1, 2), der auf einen höheren in vivo-Umsatz an Adeninnucleotiden im SZ-Diabetes zurückzuführen ist, wie er typischerweise in partiell hypoxischen Zuständen auftritt (Allison et al., 1976, Berne et al., 1979).

	ATP-Produktion (µmol/g FG)			
	Kontrolle		SZ-Diabetes	
Insulin	-	+	-	+
aus Glucoseoxidation	18,96 79 %	23,8 71,5 %	3,39 16,1%	3,82 13,8%
aus Lactatausstrom	0,226 0,9 %	1,317 4,0 %	0,77 3,7%	1,116 4 %
aus Pyruvatausstrom	3,988 16,7%	5,0 15 %	0,71 3,4%	0,8 2,9 %
aus Fettsäureoxidation	0,78 3,3%	3,19 9,6 %	16,18 76,9%	22,01 79,3%
Gesamt	23,95 100%	33,3 100%	21,05 100%	27,75 100%

Tab. 43: ATP-Produktion im isoliert-perfundierten Herzen von Kontrollen und SZ-diabetischen Ratten.
Für die Oxidation von Glucose wurde ein P/O-Quotient von 3,17, für die Fettsäureoxidation ein Quotient von 2,8 zugrunde gelegt. Ferner wurde die Bildung von 1 ATP/Lactat (Substratkettenphosphorylierung) und 4 ATP/Pyruvat (Substratkettenphosphorylierung + 1 NADH) im kardialen Effluat angenommen (Neely et al., 1972). Experimentelle Einzelheiten sind in den Legenden zu Tab. 21 und 22 angegeben.

Bei ausreichender Sauerstoffversorgung war allerdings in vitro keine vermehrte Adenosinfreisetzung durch das SZ-diabetische Herz nachzuweisen (Rösen u. Rösen, unveröffentlicht).

Der insulinabhängige hohe Creatinphosphatgehalt in SZ-diabetischen Herzen läßt den Schluß zu, daß die Konzentration an im Diabetes akkumulierenden Fettsäuren nicht ausreichen, um die Adeninnucleotranslocase zu hemmen, und unterstützt die Schlußfolgerung, daß die oxidative Phosphorylierung in den untersuchten SZ-diabetischen Herzen nicht entkoppelt ist.

Weiter folgt aus Tab. 43, daß im Kontrollherzen 19 %, im SZ-diabetischen Herzen hingegen lediglich 7 % des synthetisierten ATP aus der Glycolyse stammt. Dieser verminderte Beitrag der Glycolyse im SZ-diabetischen Herzen zur ATP-Produktion kann unter ischämischen sowie hypoxischen Bedingungen pathophysiologisch bedeutsam werden, da glycolytisch gebildetem ATP eine spezifische Funktion bei der Aufrechterhaltung des zellulären Membranpotentials zugeordnet wird (Bricknell u. Opie, 1978, Opie u. Bricknell, 1979). Eine diabetesbedingte Beschleunigung des Fettsäure-Triglycerid-Zyklus (Opie et al., 1979) würde zu einer weiteren Verringerung des glycolytisch gebildeten ATP führen und damit die Sensitivität des diabetischen Herzens gegenüber hypoxischen und ischämischen Zuständen erhöhen.

6. Regulation der myokardialen Lipolyse und Triglycerid-Homöostase

Wie bereits diskutiert, sind der Glucoseumsatz (Glycolyse und Pyruvatoxidation) sowie die Glycogensynthese im glucoseperfundierten SZ-diabetischen Herzen insulinresistent. Während die Insulinresistenz der Glycogensynthase durch einen Lipidstoffwechsel-unabhängigen Postinsulinrezeptordefekt bedingt war, konnte die Hemmung des Glucoseumsatzes auf die Verstoffwechselung von endogenen Triglyceriden zurückgeführt werden. Dementsprechend wurde durch Inhibition der Lipo-

lyse endogener Triglyceride die myokardiale Insulinsensitivität bezüglich des Glucoseumsatzes normalisiert. Da die Regulation der myokardialen Lipolyse endogener Triglyceride somit in einem kausalen Zusammenhang mit der Insulinresistenz des Glucoseumsatzes steht, wurde untersucht, welche Faktoren für die Aktivierung der myokardialen Lipolyse ausschlaggebend sind.

Für die Hydrolyse myokardialer Triglyceride sind Triacylglycerin-Hydrolasen (TGL) verantwortlich, deren intrazelluläre Verteilung, Eigenschaften und Regulation unklar sind (Biale et al., 1968, Björntorp u. Furman, 1962, Christian et al., 1969, Denton u. Randle, 1967, Hülsmann u. Stam, 1978, Mersel et al., 1979, Jesmok et al., 1976, Severson, 1979, Rösen et al., 1981).

Unter den Bedingungen des optimierten enzymatischen Testes zeigte die pH-Abhängigkeit der TGL-Aktivität Maxima bei pH 4,5 - 5,0 und pH 7,0 - 7,4 (Kap. C 4). Beide Maxima wurden auch von Severson beschrieben (1979 a, b). Das zusätzliche Maximum, das von Severson im alkalischen pH-Bereich beobachtet wurde, kann einer Lipoproteinlipase zugeordnet werden, die unter den in dieser Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen durch Präperfusion mit Heparin (Hülsmann u. Stam, 1978) entfernt wurde. Das die beobachteten TGL-Aktivitäten keine Lipoproteinlipase darstellen, folgt weiterhin aus Versuchen mit Protamin und NaCl als Inhibitoren der Lipoproteinlipase (Hamid et al., 1976, Twu et al., 1975). Da beide TGL-Aktivitäten (TGL 7,4 und TGL 4,5) auch in isolierten Herzmuskelzellen adulter Ratten nachgewiesen werden konnten, bei denen Kapillar- und Endothelgewebe durch enzymatische und mechanische Behandlung des Herzgewebes entfernt wurde (Rösen u. Eckel, in Vorbereitung), folgt, daß beide TGL-Aktivitäten in den Herzmuskelzellen selbst lokalisierte Enzyme darstellen.

TGL 4,5 und TGL 7,4 haben eine unterschiedliche intrazelluläre Verteilung. Die „saure" TGL konnte in einer mikrosomalen/lysosomalen Membranfraktion angereichert werden und stellt ein membranständiges

Enzymsystem dar, während die „neutrale" TGL gleichmäßig zwischen Cytosol und Sarkoplasma verteilt zu sein scheint (Rösen et al., 1981). Es ist allerdings nicht vollständig auszuschließen, daß die intrazelluläre Verteilung insbesondere der TGL 7,4 durch Adsorption der TGL an Membranfraktionen während des Aufarbeitungsprozesses verändert wurde und nur partiell die native Enzymlokalisation widerspiegelt. Auch wenn weitere Untersuchungen zur Identifizierung der intrazellulären Lokalisierung der neutralen TGL notwendig sind, deuten die obigen Ergebnisse sowie die Fähigkeit der neutralen TGL, Triglyceride vollständig zu hydrolysieren, im Gegensatz zur TGL 4,5, die Triglyceride nur partiell zu Mono- und Diglyceriden hydrolysiert, (Kap. C 5) daraufhin, daß beide Lipaseaktivitäten verschiedene Enzyme darstellen. Darauf weist auch der unterschiedliche Einfluß von Phosphatidylserin auf die TGL-Aktivitäten hin: Während TGL 7,4 durch Phosphatidylserin inhibiert wurde, wurde TGL 4,5 aktiviert, so daß die pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität neben einem Maximum bei pH 5,0 im neutralen pH-Bereich nur noch eine Schulter aufweist (Kap. C 5).

Da Chlorquine als lysosomotropes Agens (DeDuve et al., 1974) die Lipolyse in Herzen von Erucasäure gefütterten Ratten hemmte, wurde vorgeschlagen (Hülsmann u. Stam, 1978), daß das lysosomale Enzym (TGL 4,5) an der Lipolyse endogener Triglyceride beteiligt ist. Gegen diese Vermutung spricht allerdings die Unfähigkeit der TGL 4,5, Triglyceride vollständig zu hydrolysieren. Weiterhin hatte Chloroquine keinen signifikanten Einfluß auf die im perfundierten SZ-diabetischen Herzen beschleunigte Lipolyse (Rösen et al., 1981). Beide Befunde deuten daraufhin, daß die TGL 7,4 für die Lipolyse endogener Triglyceride im SZ-diabetischen Herzen verantwortlich ist.

Im nicht-perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten waren die Aktivitäten der TGL 7,4 und 4,5 vermindert (Kap. C 4), Perfusion der Herzen mit Glucose führte aber zu einer Aktivitätssteigerung, so daß die spezifische Aktivität der neutralen TGL 7,4 im perfundierten

SZ-diabetischen Herzen nicht signifikant von der in Kontrollherzen verschieden war (Rösen et al., 1981). Ketoazidose bedingte somit eine reversible Hemmung der TGL-Aktivitäten.
Daß die Verminderung der spezifischen Aktivitäten der TGL im ketoazidotischen Herzen nicht die Folge einer bevorzugten Hydrolyse endogener Triglyceride oder einer Änderung der spezifischen Aktivität des eingesetzten Substrates (radioaktives Triolein) durch endogene Triglyceride ist, ergibt sich aus:

(a) bei neutralem pH war die spezifische Aktivität der TGL nicht verschieden, wenn sie durch die Freisetzung von Fettsäuren aus radioaktivem Triolein oder die Bildung von Glycerin gemessen wurde, daß aus endogenen und exogenen (radioaktiven) Triglyceriden stammen kann.

(b) Endogene Triglyceride würden die spezifische Aktivität des als Substrat eingesetzten Trioleins um weniger als 5 % verändern. Zudem wurde die Verminderung der TGL-Aktivitäten im nicht-perfundierten SZ-diabetischen Herzen auch bei sehr hohen Substratkonzentrationen (>7 mmol/l) beobachtet (Kap. C 4).

Ferner folgt aus Untersuchungen an isoliert-perfundierten Herzen, daß Fettsäuren und Ketonkörper die Lipolyse inhibieren (Hron et al., 1978, Neely et al., 1969, Rösen et al., 1981). Außerdem wurde die TGL 7,4 im enzymatischen Ansatz durch Palmitoylcarnitin, Fettsäuren, Mono- und Diglyceride gehemmt (Kap. C 4). Die Untersuchungen an beiden Systemen - dem isoliert-perfundierten Herzen als auch am isolierten Enzym - belegen somit eine Produkthemmung der myokardialen Lipolyse bzw. TGL-Aktivität.

Die Lipolyse hängt im diabetischen Herzen vom endogenen Triglyceridgehalt ab und fällt mit abnehmendem Triglyceridgehalt nach längerer Perfusionszeit (>100 min.) auch im diabetischen Herzen auf Kontrollwerte ab. Es ist daher zu vermuten, daß die im perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten beschleunigte Lipolyse zumindestens teilweise Ausdruck der im Diabetes erhöhten Substratkonzentration darstellt.

Aus der maximalen Lipolyse, die im isoliert-perfundierten Herzen gemessen wurde, läßt sich eine spezifische Aktivität der involvierten TGL von 3,0 nmol/min x mg Protein abschätzen, ein Wert, der recht gut mit der spezifischenAktivität übereinstimmt, die sich unter optimalen Testbedingungen mit exogenem Triolein als Substrat ergab. Es wurde bereits darauf hingewiesen (Kap. C 4), daß die Emulgierung der wasserunlöslichen Substrate einen erheblichen Einfluß auf die spezifische Aktivität der TGL und ihre kinetischen Konstanten hat, wie am Beispiel des Phosphatidylserins gezeigt wurde. Ein Vergleich der spezifischen TGL-Aktivitäten gemessen mit unterschiedlichen Substraten ist somit nur bedingt möglich. Eine bevorzugte Hydrolyse endogener Triglyceride, wie sie von Wise u. Jungas (1978) für das Fettgewebe nachgewiesen wurde, konnte allerdings für das Herz ausgeschlossen werden.
Die myokardiale Lipolyse kann sowohl in Herzen von Kontrollen als auch SZ-diabetischer Ratten durch Catecholamine beschleunigt werden (Challoner u. Steinberg, 1965, Crass et al., 1975, Kreisberg, 1966, C 4). Die im Diabetes erhöhte Lipolysewurde allerdings weder durch den ß-Antagonisten Propranolol noch durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Reserpin zur Entleerung der endogenen Catecholaminspeicher beeinflußt (C 3). Da außerdem Kontrollen und SZ-diabetische Herzen keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an cyclischen Nucleotiden und der Adenylcyclase-Aktivität aufwiesen (Kap. C 5) und auch enzymatische Untersuchungen im Gegensatz zum Fettgewebe (Steinberg, 1977) keine Hinweise auf eine direkte Aktivierung der TGL über einen c-AMP-abhängigen Mechanismus in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern (Severson, 1979) ergaben, ist anzunehmen, daß keine ß-adrenergen Mechanismen und keine direkte hormonelle Regulation der TGL für die im Diabetes erhöhte myokardiale Lipolyse verantwortlich sind.

Zusammengefaßt legen die Befunde eine Kontrolle der Lipolyse und TGL-Aktivitäten durch Produkthemmung und Substratsteuerung nahe (Abb. 30). Die catecholaminbedingte Steigerung der Lipolyse wäre auf eine Verminderung der Konzentration an Fettsäuren infolge erhöh-

ten Durchsatzes von Fettsäuren durch die ß-Oxidation zu verstehen. Im stillgestellten Herzen und bei Sauerstoffmangel wurde durch Adrenalin die Glycogenolyse verstärkt, so daß durch Reveresterung mit α-Glycerin-P die lipolytisch entstandenen Fettsäuren abgefangen und in den Triglyceridpool zurückgeführt werden können. Ein ähnlicher Mechanismus erklärt auch die Beschleunigung der Lipolyse durch Insulin, das keinen direkten Einfluß auf die spezifische Aktivität der TGL hatte. Aus dem Vergleich des Nettoumsatzes an myokardialen Triglyceriden mit dem die Lipolyse kennzeichnenden Glycerinausstrom folgt, daß Insulin die Verfügbarkeit von α-Glycerin-P erhöht, die Rückveresterung der lipolytisch gebildeten Fettsäuren beschleunigt und damit eine Akkumulation von Produkten der Lipolyse, die zur Hemmung der TGL führten könnten, verhindert. Untersuchungen von Jansen et al., (1975) und Hülsmann und Stam (1978) unterstützen diese Schlußfolgerung, indem sie nachwiesen, daß eine Aktivierung der Lipolyse in Herzen erucasäuregefütterter Ratten durch Catecholamine und hohe Konzentrationen an Glucagon (> 10 µmol/l) an die Aktivierung der Glycogenolyse und Glycolyse gekoppelt ist.

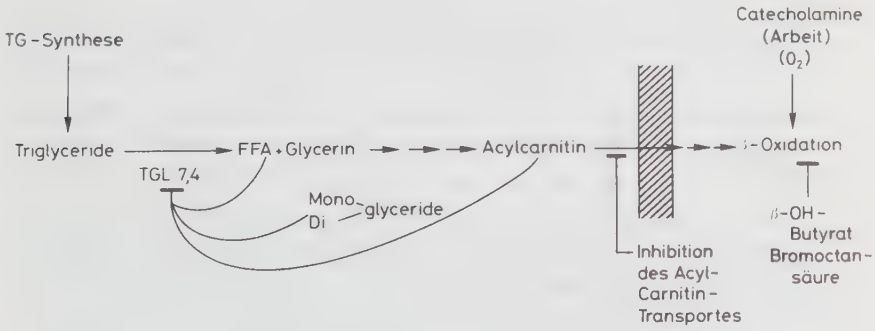


Abb. 28: Regulation der myokardialen Lipolyse

Eine verringerte ß-Oxidation sowie eine Inhibition des Transportes von Fettsäuren in das mitochondrielle Kompartiment sollten zur Produkthemmung der TGL-Aktivität und damit der myokardialen Lipolyse führen, eine Hypothese, die sowohl durch enzymatische Untersuchungen als auch durch Ergebnisse am isoliert-perfundierten Herzen unterstützt wird (Kap. C 3 und 5). Umgekehrt ist zu fordern, daß eine Vergrößerung der Arbeitsleistung, höherer Sauerstoffverbrauch, aber auch eine Beschleunigung der Glycogenolyse die myokardiale Lipolyse steigern, was ebenfalls durch experimentelle Befunde belegt wird (Kap. C 4, Hülsmann u. Stam, 1978).

Die TGL-Aktivität ist somit im wesentlichen abhängig und reguliert vom Umsatz der lipolytisch gebildeten Fettsäuren entweder durch die ß-Oxidation oder die Reveresterung zu Glyceriden. Eine Akkumulation von Triglyceriden im Herzmuskel wäre somit einerseits Folge der Inhibition des Fettsäureumsatzes, würde andererseits aber auf Grund der Substratgeschwindigkeitsbeziehung zur Beschleunigung der Lipolyse beitragen, sobald die Metabolisierung der lipolytisch gebildeten Fettsäuren gewährleistet ist.

Die beschriebene Hypothese zur Regulation der myokardialen Lipolyse würde auch die bereits bekannte Akkumulation von Triglyceriden in SZ- (Kap. C 2) und alloxandiabetischen Rattenherzen (Denton u. Randle, 1967, Rizza, 1971, Murthy u. Shipp, 1979) unter ketoazidotischen Bedingungen erklären, da der Transport von langkettigen Fettsäuren in die Mitochondrien-Matrix über den spezifischen Mechanismus des Acylcarnitin-Transfers als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt erfolgt, dieser Mechanismus aber nicht für Ketonkörper limitierend ist (Williamson, 1968, 1979); d.h. unter ketoazidotischen Bedingungen ist die Fettsäureoxidation inhibiert mit der Folge, daß im Herzen Triglyceride akkumulieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese steht auch die Beobachtung, daß die spezifischen Aktivitäten der an der Triglyceridsynthese beteiligten Enzyme wie der Fettsäurethiokinase, der Phosphatid-Hydrolase, der Diglycerid-acyl-Transferase durch die Induktion eines ketoazidotischen Diabetes nicht beeinflußt wurden (Murthy u. Shipp, 1979, 1980).

Eine Zunahme der myokardialen Triglyceride setzt somit sowohl eine hohe Konzentration an Plasmafettsäuren als auch eine Limitierung der Fettsäureoxidation voraus. Derartige regulatorische Wechselwirkungen zwischen Lipolyse und Fettsäureoxidation wären physiologisch auch sinnvoll, da ein derartiger Mechanismus den Triglycerid-Fettsäure-Zyklus im Sinne eines „futile cycle" (Opie et al., 1979) und den dadurch bedingten Verlust an energiereichen Phosphaten limitieren würde.

Neben den bereits angeführten experimentellen Befunden wird die diskutierte Hypothese durch folgende Ergebnisse belegt:

(a) Triglyceride akkumulieren im Herzen nur unter ketoazidotischen Bedingungen, unter denen trotz hohen Substratangebotes die Fettsäureoxidation limitiert ist (Kap. C 1, Crass, 1972, Hron et al., 1978, Murthy u. Shipp, 1979).

(b) Im isoliert-perfundierten Herzen wurde eine vermehrte Triglyceridsynthese nach Zugabe von Acetoacetat zum palmitatperfundierten Herzen beobachtet (Olson u. Hoeschen, 1967).

(c) Hemmung der Fettsäureoxidation bedingte eine Zunahme des Gehaltes an myokardialen Triglyceriden (Neely u. Morgan, 1974, Shipp et al., 1961, Murthy u. Shipp, 1979).

(d) Die Lipolyse endogener Triglyceride wurde im isoliert-perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten durch Ketonkörper gehemmt (Rösen et al., 1981).

(e) Die TGL wurde durch Fettsäuren und Hydrolyseprodukte von Triglyceriden inhibiert (Kap. C 4).

Der myokardiale Gehalt an freien Fettsäuren war in Kontrollherzen niedrig in Übereistimmung mit Literaturdaten (Denton u. Randle, 1967, Liu u. Spitzer, 1978, van der Vusse et al., 1978, Kramer u. Hulan, 1978) und nahm in SZ-diabetischen Herzen ähnlich wie im Alloxan-Diabetes (Liu u. Spitzer, 1978, Denton u. Randle, 1967) leicht zu. Dieser Anstieg im Gehalt an freien Fettsäuren war jedoch nicht wie die der Triglyceride an ketoazidotische Bedingungen geknüpft, sondern wurde

auch im „chronischen Diabetes" beobachtet (C 1) und kann als Ausdruck der hyperlipämischen Bedingungen in vivo verstanden werden. Wir glauben nicht, daß die beschriebene Erhöhung der freien Fettsäuren im diabetischen Herzen bereits pathophysiologisch bedeutsam im Sinne einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung wirkt (vgl. S. 130 - 132).

Im Gegensatz zu den Fraktionen der Triglyceride und freien Fettsäuren wurde der myokardiale Gehalt an Phospholipiden durch die Induktion eines experimentellen Diabetes nicht beeinflußt.

Versucht man die diabetesinduzierten Änderungen in der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen myokardialen Lipidfraktionen zusammenfassend zu charakterisieren, so läßt sich feststellen, daß ein Anstieg des Öl- und Linolsäureanteils in der freien Fettsäure- und Triglyceridfraktion eintrat, während der prozentuale Anteil der Linolen- und Arachidonsäure in diesen beiden Lipidfraktionen abnahm. Eine Abnahme im Verhältnis von ein- und zweifach zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren war die Folge. Die Ursachen für diese Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung sind nicht bekannt. Eine verminderte Desaturase-Aktivität wurde für die Leber alloxandiabetischer Ratten beschrieben (Brenner et al., 1966, Friedman et al., 1966). Es wird z.Zt. untersucht, inwieweit die genannten qualitativen Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung für die im diabetischen Herzen verminderte Biosynthese von Prostaglandinen (Rösen u. Schrör, 1980, Rösen et al., 1983) relevant ist.

E ZUSAMMENFASSUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind im Diabetes mellitus von besonderer pathophysiologischer Bedeutung. Neben vaskulären Veränderungen werden metabolische Defekte - insbesondere Störungen des Glucose- und Fettstoffwechsels - als Ursache für die beobachteten funktionellen Einschränkungen des diabetischen Herzens diskutiert.

Ziel der Untersuchungen war es deshalb, die Wechselwirkungen zwischen Glucose- und Lipidstoffwechsel sowie ihre Bedeutung für die Insulinresistenz des Herzens zu charakterisieren.

Für derartige Untersuchungen erwies sich das isoliert-perfundierte Herz als tierexperimentelles Modell geeignet, da es neben der Registrierung der funktionellen Parameter sowohl die Bestimmung von kinetischen Stoffwechselgrößen (Lactat- und Pyruvatproduktion, Glucoseoxidation, Glycogensynthese, Relation zwischen Substrat- und Glycogenglucose, Lipolyse) als auch des Stoffwechselzustandes des Herzens (stationäre Konzentration wichtiger Metabolite im Herzen und Enzymaktivitäten) ermöglicht. Im Gegensatz zu Literaturdaten erwies es sich als notwendig, ein offenes Perfusionssystem zu verwenden, um Interferenzen von Stoffwechselprodukten (Lactat und Pyruvat) mit dem myokardialen Glucosestoffwechsel auszuschließen, was insbesondere für die Regulation der Phosphofructokinase und Pyruvatdehydrogenase von Bedeutung ist.

Als Diabetes Typ I Modell wurde ein durch Applikation von Streptozotocin (SZ) bedingter Stoffwechselzustand verwendet, der durch die Kriterien: Glucosurie, Hyperglykämie, Insulinmangel, Ketonurie und Ketoazidose gekennzeichnet werden kann. In diesem frühen Stadium des Diabetes (3 - 4 Tage nach Applikation von SZ) sind vaskuläre Veränderungen noch nicht nachzuweisen.
Funktionell unterschieden sich SZ-diabetische Herzen von Kontrollen

nicht im Sauerstoffverbrauch und in der Schlagfrequenz. dp/dt_{max} als Maß für die Kontraktilität des Herzens war zu Beginn der Perfusionszeit im SZ-Diabetes erniedrigt. Der koronare Fluß war im SZ-diabetischen Herzen deutlich erhöht. Diese funktionellen Änderungen im SZ-diabetischen, glucoseperfundierten Herzen werden als Ausdruck der zu Beginn der Perfusion herrschenden azidotischen Bedingungen interpretiert. Die Steigerung des koronaren Flusses ist nicht durch eine vermehrte Freisetzung von Adenosin oder Prostaglandinen zu erklären.

Der Stoffwechsel des Herzens im SZ-Diabetes erwies sich als insulinresistent bezüglich der Lactat- und Pyruvatproduktion, der Glucoseoxidation und Glycogensynthese und zwar in dem Sinne, daß auch bei hoher Insulinkonzentration die biologische Antwort vermindert blieb (Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve bei gleichzeitig submaximaler biologischer Antwort).

Der Lactat- und Pyruvatausstrom war im SZ-diabetischen Herzen unter basalen Bedingungen (ohne Insulin), aber auch mit Insulin gegenüber der Kontrolle erhöht; die Glycolyserate erreichte allerdings nur 75 % des mit Glucose und Insulin perfundierten Kontrollherzens. Zusammen mit dem raschen Abfall des Glucose-6-P/Fructose-1,6-biphosphat-Quotienten deuten diese Befunde daraufhin, daß die in vivo unter ketoazidotischen oder bei hohen Plasmafettsäuren zu beoachtende Hemmung der Phosphofructokinase im glucoseperfundierten Herzen von untergeordneter Bedeutung ist. Dementsprechend verringerte sich der in vivo beobachtete Anstau von Glucose-6-P bei Perfusion von Herzen SZ-diabetischer Ratten. Im Gegensatz zur Phosphofructokinase bleibt die Pyruvatdehydrogenase bei Perfusion SZ-diabetischer Herzen gehemmt, wobei sowohl eine Produkthemmung durch Acetyl-CoA als auch eine inhibierte Interkonvertierung der PDH_b von Bedeutung sind. Der geringe Glucoseumsatz im SZ-diabetischen Herzen weist somit auf eine im Insulinmangel verminderte Glucoseaufnahme hin.

Da sowohl die Erschöpfung der myokardialen Triglyceride als auch die Blockierung der Carnitinpalmitoyltransferase 1 durch POCA die Insulinsensitivität des diabetischen Herzens bezüglich der Lactatproduktion, Glucoseoxidation und - wie aus der Glycolyserate folgt - auch der Glucoseaufnahme wiederherstellte, ist anzunehmen, daß die im Insulinmangel verminderte Glucoseaufnahme und -metabolisierung sowie die Insulinresistenz des SZ-diabetischen Herzens lipidstoffwechselabhängig sind; d.h. im glucoseperfundierten Herzen ist die Insulinresistenz des Glucoseumsatzes bedingt durch die Lipolyse endogener Triglyceride sowie der Oxidation der lipolytisch gebildeten Fettsäuren. Im Sinne des Glucose-Fettsäure-Zyklus führen Fettsäuren aus endogenen Lipidpools zum Fortbestehen der Insulinresistenz im glucoseperfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten. Da sich kein Glucose-6-P-Anstau im glucoseperfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten wie in vivo nachweisen ließ, kann die Insulinresistenz der Glucoseaufnahme nicht metabolisch als Folge der inhibierten Glycolyse erklärt werden, sondern stellt einen Postinsulinrezeptordefekt dar, der vermutlich eine direkte Wechselwirkung zwischen dem Glucose-Carrier und Metaboliten des Lipidstoffwechsels voraussetzt.

Aus der Reversibilität der Insulinresistenz des Glucoseumsatzes bei Hemmung des endogenen Lipidmetabolismus folgt weiterhin, daß unter den experimentelllen Bedingungen Insulinrezeptordefekte selbst von untergeordneter Bedeutung für die Insulinresistenz des Glucosestoffwechsels des Herzens sind.

Im Gegensatz zum Glucoseumsatz bleibt die Glycogensynthese des SZ-diabetischen Herzens auch bei Inhibition der Lipolyse insulinresistent. Wir vermuten auf Grund enzymatischer Untersuchungen der Glycogensynthase und Glycogenphosphorylase, daß die Aktivierungsmechanismen dieser beiden interkonvertierbaren Enzyme im Diabetes verändert sind. Die Glycogensynthase bleibt auch bei Perfusion der Herzen mit Insulin im Diabetes in ihrer inaktiven Form, während die

Glycogenphosphorylase „hypersensitiv" und im Vergleich zu Kontrollen rasch aktiviert wird. Dies erklärt, daß im diabetischen Herzen die Glycogenolyse überwiegt. Wir vermuten, daß für die Aktivierung der Glycogenphosphorylase Veränderungen in der Calciumaufnahme verantwortlich sind, die über eine calciumabhängige Aktivierung der Phosphorylasekinase das Gleichgewicht der Formen der Phosphorylase in Richtung phosphorylierter, aktiver Phosphorylase verschieben. Für die Glycogensynthase wurde ein Defekt auf der Ebene der Glycogensynthase-phosphatase (Inhibitor-1-Protein) als Ursache der Insulinresistenz vorgeschlagen. Die Akkumulation von Glycogen im SZ-diabetischen Herzen in vivo erklärt sich durch die Aktivierung der Glycogensynthase D durch akkumulierendes Glucose-6-P.

Die Insulinresistenz im SZ-diabetischen Herzen weist demnach zumindestens zwei unterschiedliche Postinsulinrezeptordefekte auf:
Lipidstoffwechselabhängig: Glucoseumsatz,
Lipidstoffwechselunabhängig: Glycogensynthese.

Voraussetzung für die Fortdauer der Insulinresistenz des Glucoseumsatzes im glucoseperfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten ist die Akkumulation von Triglyceriden. Perfusionsexperimente und enzymatische Untersuchungen lassen folgenden Schluß zu: unter ketoazidotischen Bedingungen ist die Oxidation langkettiger Fettsäuren gehemmt, deren Transport in die Mitochondrien-Matrix im Gegensatz zu Ketonkörpern durch die Aktivität der Carnitinpalmitoyltransferase limitiert wird. Folge ist die Produkthemmung der Triacylglycerin-Hydrolase durch Fettsäuren, Acyl-CoA und Carnitinderivate sowie die Akkumulation von Triglyceriden im Herzen. Bei Perfusion SZ-diabetischer Herzen mit Glucose kommt es zu einer substratabhängigen Aktivierung der TG-Lipase. Die Lipolyse setzt Fettsäuren aus endogenen Triglyceriden frei, die zum wichtigsten Substrat im perfundierten Herzen werden und den Glucoseumsatz inhibieren (Glucoseaufnahme, Pyruvatdehydrogenase).

Insulin und Adrenalin haben nur einen indirekt modulierenden Einfluß

auf die TG-Lipase-Aktivität, indem sie die Rückveresterung der lipolytisch gebildeten Fettsäuren durch Bereitstellung von α-Glycerin-P beeinflussen und somit die Produkte der TG-Lipase aus dem Reaktionszyklus entfernen.

Für den Energiestoffwechsel bedeutet die vorherrschende Fettsäureoxidation sowie der cytosolische Energieverbrauch durch Rückveresterung von lipolytisch gebildeten Fettsäure, daß der Anteil an glycolytisch gebildetem ATP in SZ-diabetischen Herzen deutlich erniedrigt ist. Gleichzeitig ist der Nucleotidpool im SZ-diabetischen Herzen vermindert. Dies kann insbesondere bei hypoxischen und ischämischen Zuständen von pathobiochemischer Bedeutung sein, wenn glycolytisch gebildetes ATP tatsächlich - wie vermutet wird - eine spezifische Funktion für die Strukturerhaltung der Zellmembran hat.

Für eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung ergaben sich aus unseren Untersuchungen trotz der im SZ-diabetischen Herzen vermehrten freien Fettsäuren keine Hinweise; die geänderte Fettsäurezusammensetzung wird als bedeutungsvoll für die endogene Prostaglandinbiosynthese angesehen.

F LITERATUR

Adolfson, S., Isaksson, O., Hjalmarson. A.: Effect of insulin on glycogensynthesis and glycogensynthetase enzym activity in the perfused rat heart. Biochim. Biophys. Acta 279, 146 - 156, (1972)

Allison, T.B., Bruttig, S.P., Crass III, M.F., Eliot, R.S., Shipp, J.C.: Reduced high energy phosphate levels in rat hearts. I. Effects of alloxan diabetes. Am. J. Physiol. 230, 1744 - 1750, (1976)

Atkinson, D.E.: The energy charge of the adenylate pool as a regulative parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry 7, 4030 - 4034, (1968)

Axelrod, L., Lloyd-Jones, P., Martin, D.B.: Correction of ketosis by suppression of lipolysis with 5-methylpyrazole-3-carboxylic acid in rats with established diabetic ketoacidosis. Diabetes 28, 651 - 657, (1979)

Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, (1974)

Berne, R.M., Foley, D.H., Watkinson, W.P., Miller, H., Weim, R., Rubio, R.: Role of adenosine as a mediator of metabolic vasodilation. Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adeninenucleotides (Hrsgb. H.P. Baer, G.I. Drummond), Raven Press, New York, S. 117 - 126, (1979)

Boggs, J.M.: Intermolecular hydrogen binding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes. Canad. J. Biochem. 58, 755 - 770, (1980)

Borner, F., Odermatt, G., Froesch, E.R.: Effects of insulin on isolated perfused hearts of normal and diabetic rats: receptor binding, glucose utilization and glycogen metabolism. Diabetologia 23, 157, (1982) (Abstrakt)

Brenner, R.R., Peluffo, O., Mercuri, O., Pestelli, M.A.: Effect of arachidonic acid in the alloxan-diabetic rat. Am. J. Physiol. 215, 63 - 70, (1966)

Biale, Y., Gorin, E., Shafrir, E.: Characterization of tissue lipolytic and esterolytic activities clearing full and partial glycerides. Biochim. Biophys. Acta 152, 28 - 32, (1968)

Björntorp, P., Furman, R.H.: Lipolytic activity in rat heart. Am. J. Physiol. 203, 323 - 326, (1962)

Boucher, C.A., Fallon, J.T., Johnson, R.A., Yurchak, P.M.: Cardiomyopathic syndrome caused by coronary artery disease. Br. Heart J. 41, 613 - 626, (1979)

Bricknell, O.L., Opie, L.H.: Effects of substrates on tissue metabolic changes in the isolated perfused heart during perfusion and on release of LDH and arhythmias during reperfusion. Circ. Res. 43, 102 - 105, (1978)

Brosky, G., Logothetopoulos, J.: Streptozotocin-Diabetes in the mouse and guinea-pig. Diabetes 18, 606 - 611, (1969)

Brownlee, M., Cahill, G.F.: Diabetic control and vascular complications. Atherosclerosis Reviews 4, 29 - 70, (1979)

Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O., Sies, H.: State of oxidation-reduction and state of binding in the cytosolic NADH-system as disclosed by equilibrium with extracellular lactate und pyruvate in hemoglobin free perfused rat liver. Eur. J. Biochem. 27, 301 - 317, (1972)

Burges, R.H., Butt, W.D., Randle, P.J., Baggaley, A.: Some effects of 2-bromopalmitate, an inhibitor of fatty acid oxidation, on carbohydrate metabolism in the rat. Biochem. J. 109, 38 - 39p, (1968)

Chain, E.B., Mansford, K.R.L., Opie, L.H.: Effects of insulin on the pattern of glucose metabolism in the perfused working and Langendorff heart of normal and insulin deficient rats. Biochem. J. 115, 537 - 546, (1969)

Challoner, D.R., Steinberg, D.: Metabolic effect of epinephrine on the QO_2 of the arrested isolated perfused heart. Nature 205, 602 - 603, (1965)

Chase, J.F.A., Tubbs, P.K.: Specific inhibition of mitochondrial fatty acid metabolism by 2-bromopalmitate and its coenzyme A and carnitine esters. Biochem. J. 129, 55 - 65, (1972)

Chlaralampros, F.C., Hegsted, D.M.: Effect of age and diet on development of cataracts in diabetic rats. Am. J. Physiol. 161, 540-544, (1950)

Christian, D.R., Kilsheimer, G.S., Pettett, G., Paradise, R., Ashmore, J.: Regulation of lipolysis in cardiac muscle: a system similar to the hormone sensitive lipase of adipose tissue. Adv. in Enzyme Requl. (Hrsgb. G. Weber), Vol. 7, 71 - 82, Pergamon Press, New York, (1969)

Clark, L.C., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z.: Continous recording of blood oxygen tension by polarography. J. Appl. Physiol. 6, 189 - 193, (1953)

Clark, M.G., Filsell, O.H., Patten, G.S.: Epinephrine activation of PFK in perfused rat heart. J. Biol. Chem. 257, 271 - 276, (1982)

Cohen, P.: The role of calmodulin, troponin and cyclic AMP in the regulation of glycogen metabolism. Adv. in Cycl. Nucleotide Res. 14, 345 - 359, (1981)

Cortner, J.A., Coates, P.M., Swoboda, E., Schmatz, J.D.: Genetic variation of lysosomal acid lipase. Pedriatr. Res. 10, 927 - 937, (1976)

Crall, F.W., Roberts, W.C.: The extramural and intramural coronary arteries in juvenile diabetes mellitus. Am. J. Med. 64, 221 - 230, (1978)

Crass, M.F. III.: Exogenous substrate effects on endogenous lipid metabolism in the working heart. Biochim. Biophys. Acta 280, 71 - 81, (1972)

Crass, M.F. III., Shipp, J.C., Pieper, G.M.: Effects of catecholamines on myocardial endogenous substrates and contractivity. Am. J. Physiol. 228, 618 - 627, (1975)

Danforth, W.H., Lyon, J.B.: Glycogenolysis during tetanic contraction of isolated mouse muscles in the presence and absence of phosphorylase a. J. Biol. Chem. 239, 4047 - 4050, (1964)

Das, I.: Effect of diabetes and insulin on the rat heart adenylcyclase, c-AMP, c-AMP-Phosphodiesterase and c-AMP. Horm. metab. Res. 5, 330 - 333, (1973)

Davis, J.L., Lewis, S.B., Schultz, T.A., Kaplan, R.A., Wallin, J.D.: Acute und chronic phosphate depletion as modulator of glucose uptake in rat skeletal muscle. Life Sciences 24, 629 - 632, (1979)

De Duve, C., Debracy, T., Poole, B., Trouet, A., Tullens, P., van Hoff, F.: Lysosomotropic agents. Biochem. Pharmacol 23, 2495 - 2531, (1974)

Denton, R.M., Randle, P.J.: Concentrations of glycerides and phospholipids in rat heart and gastrocnemius muscles. Effects of alloxan diabetes and perfusion. Biochem. J. 104, 416 - 422, (1967)

Denton, R.M., Hughes, W.A., Bridges, B.J., Brownsey, R.W., Mc Cormack, J.J., Stansbie, D.: Hormones and cell regulation (Hrsgb. J. Dumont, J. Nunez), Elsevier, Amsterdam, Vol. 2, 191 - 208, (1978)

Ditzel, J., Standl, E.: The problem of tissue oxygenation in diabetes mellitus. Acta Med. Scand. 578 (Suppl. 49 - 58), (1975)

Dombradi, V., Vereb, G., Bot, G.: Interaction of ligands with glycogen phosphorylase as revealed by affinity chromatography. Int. J. Biochem. 10, 905 - 908, (1979)

Drummond, G.L., Duncan, L.: Adenylcyclase in cardiac tissue. J. Biol. Chem. 245, 976 - 983, (1970)

Eistetter, K., Wolf, P.O.: Synthesis and hypoglycemic activity of phenylalkyloxiranecarboxylic acid derivatives. J. Med. Chem. 25, 109 - 113, (1982)

England, P.J., Randle, P.J.: Effectors of rat heart hexokinase and the controle of glucose phosphorylation in the perfused rat heart. Biochem. J. 105, 907 - 920, (1967)

Evans, J.R., Opie, L.H., Shipp, J.C.: Metabolism of palmitic acid in perfused rat heart. Am. J. Physiol. 205, 766 - 770, (1963)

Fischer, V.W., Barner, H.B., Leskiaw, M.L.: Capillary basal laminar thickness in diabetic human myocardium. Diabetes 28, 713 - 719, (1979)

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 226, 497 - 509, (1957)

Foulkes, J.J., Jefferson, L.S., Cohen, P.: The hormonal control of glycogen metabolism dephosphorylation of protein phosphatase inhibitor 1 in vivo in response to insulin. Febs. Lett. 112, 21 - 24, (1980)

Fox, C., Darby, S.C., Ireland, J.T., Sönksen, P.H.: Blood glucose control and glomerular membrane thickening in experimental diabetes. Br. Med. J. II, 605 - 607, (1977)

Frerichs, H., Creutzfeld, W.: Der experimentelle chem. Diabetes. in „Handbuch der exp. Pharmakologie" Bd. XXXII/1 Insulin, Springer Verlag, Berlin, 159 - 202, (1971)

Friedemann, N., Gellhorn, A., Benjamin, W.: Synthesis of arachidonic acid from linoleic acid in vivo in diabetic rats. J. Israel J. Med. Sci. 2, 672 - 682, (1966)

Garcia, M.J., Mc Namara, P.M., Gordon, T., Kannell, W.B.: Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Diabetes 23, 537 - 546, (1969)

Garland, P.B., Newsholme, E.A., Randle, P.J.: Effects of alloxan diabetes and adrenaline on concentration of free fatty acids in rat heart and diaphragm muscles. Nature 199, 381 - 382, (1963)

Garland, P.B., Newsholme, E.A., Randle, P.J.: Citrate as an intermediary in the inhibition of PFK in rat heart and muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation. Nature 200, 169 - 170, (1963)

Garland, P.B., Randle, P.J.: Regulation of glucose uptake by muscle X. Effects of alloxan diabetes, starvation. Biochem. J. 93, 678 - 687, (1964)

Garland, P.B., Randle, P.J.: Control of pyruvate dehydrogenase in the perfused heart by the intracellular concentration of acetyl-coenzyme A. Biochem. J. 91, 6 - 7c, (1964)

Gilboe, D.P., Larson, K.L., Nuttall, F.Q.: Radioactive method for the assay of glycogen phosphorylase. Anal. Biochem. 47, 20 - 27, (1972)

Gilboe, D.P., Nuttal, F.Q.: The role of ATP and glucose-6-phosphate in the regulation of glycogensynthetase-D-phosphatase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 898 - 906, (1972)

Gilman, Y.: A protein binding assay for adenosine 3',5'cyclic monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. US 67, 305 - 312, (1970)

Goetsche, O.: Abnormal calcium uptake in response to isproterenol in experimental diabetes. Diabetologia 21, 276, (1981)

Goetz, F.C.: Prognosis in diabetes mellitus. in „Diabetes mellitus: Diagnosis and Treatment, Vol. 2, 177 - 183, New York Am. Diabetes Ass. Inc. (Hrsgb. J. Hamiwi, T.J. Danowski), (1967)

Hamby, R.I., Zoneraich, S., Sherman, L.: Diabetic cardiomyopathy. JAMA 229, 1749 - 1754, (1974)

Hamid, M.A., Lech, J.J., Barboriak, J.J., Calvert, D.N., Jesmok, G.J.: Some properties of protamine-stimulated triglyceride-hydrolyzing enzyme from rat ventricle. Biochem. Pharmacol. 22, 2165 - 2170, (1973)

Hansford, R.G.: Studies on the effects of coenzyme A-SH: Acetyl coenzyme A, nicotinamide adenine dinucleotide, reduced nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine diphosphate: adenosine triphosphate ratios on the interconversion of active and inactive PDH in isolated rat heart mitochondria. J. Biol. Chem. 251, 5483 - 5489, (1976)

Hansford, R.G.: Studies on inactivation of PDH by palmitoylcarnitine oxidation in isolated rat heart mitochondria. J. Biol. Chem. 252, 1552 - 1560, (1977)

Heilmeyer, L.M.G., Meyer, F., Haschke, R.H., Fischer, E.H.: Control of phosphorylase activity in a muscle glycogen particle. II. Activation by calcium. J. Biol. Chem. 254, 6649 - 6656, (1970)

Hohenegger, M., Rudas, B.: Nierenversagen beim experimentellen Diabetes mellitus. Z. inn. Med. 52, 36 - 40, (1971)

Hohenegger, M., Rudas, B.: Kidney function in experimental diabetic ketosis. Diabetologia 7, 334 - 338, (1971)

Hron, W.T., Menahan, L.H., Lech, J.J.: Inhibition of hormonal stimulation of lipolysis in perfused rat heart by ketone bodies. J. Mol., Cell. Cardiol. 10, 161 - 174, (1978)

Hülsmann, W.C., Stam, H.: Intracellular origin of hormone sensitive lipolysis in the rat heart. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 53 - 59, (1978)

Ingebretsen, W.R., Peralta, C., Monsher, M., Wagner, L.K., Ingebretsen, C.G.: Diabetes alters the myocardial c-AMP protein-kinase cascade system. Am. J. Physiol. 240, H375 - 382, (1981)

Jansen, H., Hülsmann, W.C., Zuylen-van Wiggen, A., van Struijk, C.B., Houtsmuller, U.M.T.: Influence of rapeseed oil feeding on the lipase activities of rat heart. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 747 - 751, (1975)

Jesmok, G.J., Mogelnicki, S.R., Lech, J.J., Calvert, D.N.: Effects of polyamines, ions and epinephrine on triolein hydrolyzing activity of rat ventricular extracts. J. Mol. Cell. Cardiol. 8, 283 - 298, (1976)

Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., Renold, A.E.: Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. J. Clin. Invest. 48, 2129 - 2139, (1969)

Kahn, C.R.: Insulinresistance, insulinsensitivity, a necessary distrinction. Metabolism 27, 1893 - 1902, (1978)

Katsilambros, N., Abdel Rahman, Hinz, M., Fussgänger, R., Schröder, K.E., Straub, K., Pfeiffer, E.A.: Effect of streptozotocin on insulin and glucagon responses of rat islets. Horm. Metab. Res. 2, 268 - 270, (1970)

Kauppinen, R.A., Hiltunen, J.K., Hassinen, J.E.: Compartmentation of citrate in relation to the regulation of glycolysis and the mitochondrial transmembrane proton electrochemical potential gradient in isolated perfused rat heart. Biochim. Biophys. Acta 681, 286 - 291, (1982)

Kerbey, A.L., Randle, P.J., Cooper, R.H., Whitehouse, S., Park, H.T., Denton, R.M.: Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of CoA, acetyl-CoA and reduced and oxidized nicotinamide adenine dinucleotide. Biochem. J. 154, 327 - 348, (1976)

Kiesel, U., Greulich, B., Marx-Soho Moume, C., Kolb, H.: Induction of experimental autoimmune diabetes by low dose of streptozotocin treatment in genetically resistant mice. Immunology Lett. 3, 227 - 230, (1981)

Kipnis, D.M.: Regulation of glucose uptake by muscle: functional significance of permeability and phosphorylating activity. Ann. N.Y. Acad. Sci. 82, 354 - 365, (1959)

Knowlton, F.P., Starling, E.H.: Experiments on the consumption of sugar in the normal and diabetic heart. J. Physiol. (London) 45, 146 - 163, (1912)

Korn, E.D.: Clearing factor, a heparin activated lipoprotein lipase. J. Biol. Chem. 215, 1 - 26, (1955)

Kramer, J.K.G., Hulan, H.W.: A comparison of procedures to determine free fatty acids in rat heart. L. Lipid. Res. 19, 103 - 106, (1978)

Kramer, J.K.G., Hulan, H.W.: The effect of dietary erucic acid on cardiac triglycerides and free fatty acid levels in rats. Lipids 13, 438 - 445, (1978)

Krebs, H.A., Henseleit, K.: Untersuchungen über Harnstoffbildung im Tierkörper. Z. Physiol. Chem. 210, 33 - 66, (1932)

Kreisberg, R.A.: Effect of epinephrine on myocardial triglyceride and free fatty acid utilization. Am. J. Physiol. 210, 385 - 389, (1966)

Langendorff, O.: Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. Pflügers Arch. 61, 291 - 332, (1895)

Larner, J., Rosell-Perez, M., Friedmann, D.L., Craig, J.W.: Insulin and the control of UDPG-a-Glucan-Transglucosylase activity. in „Control of glycogen metabolism" (Hrsgb.: W.J. Whelan) Churchill, London, 273 - 288, (1974)

Lassers, B.W., Kaijser, L., Carlson, L.A.: Myocardial lipid and carbohydrate metabolism in healthy fasting man at rest: Studies during infusion of ^{3}H-palmitate. Eur. J. Clin. Invest. 2., 348 - 358, (1972)

Ledet, T.: Histological and histochemical changes in the coronary arteries of old diabetic patients. Diabetologia 4, 268 - 272, (1968)

Ledet, T.: Diabetic cardiopathy. Acta Pathol. Microbiol. Scand. (A) 84, 421 - 428, (1976)

Lehninger, A.L.: Biochemie, 2. Auflage, Verlag Chemie Weinheim, (1979)

Le Marchand-Brustel, Y., Cohen, P.T.W., Cohen, P.: Insulin activates glycogensynthase in phosphorylase kinase deficient mice. Febs. Lett. 105, 235 - 238, (1979)

Liu, M.S., Spitzer, J.J.: Fatty acid and lactate metabolism by heart homogenates from alloxan-diabetic dogs. Hormon. Metab. Res. 10, 114 - 117, (1974)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275, (1950)

Mansford, K.R.L., Opie, L.H.: Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. Lancet 1, 670 - 671, (1968)

Mansour, T.E.: PFK activity in skeletal muscle extracts following administration of epinephrine. Curr. Top. Cell. Regul. 5, 1 - 46, (1972)

Mc Allister, A., Allison, S.P., Randle, P.J.: Effects of Dichloracetic acid on metabolism of glucose, pyruvate, acetate, 3-hydroxybutyrate and palmitate in rat diaphragm and heart muscle in vivo and on extraction of glucose, lactate, pyruvate and free fatty acids by dog heart in vivo. Biochem. J. 134, 1067 - 1081, (1973)

Mc Garry, J.D., Foster, D.W.: Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. Ann. Rev. Biochem. 49, 395 - 420, (1980)

Mersel, M., Heller, M., Pinson, A.: Intracellular lipase activities in heart and skeletal muscle homogenates. Biochim. Biophys. Acta 572, 218 - 224, (1979)

Meuli, C., Froesch, E.R.: Binding of insulin and non-suppressible insulin-like activity to isolated perfused rat heart muscle. Arch. Biochem. Biophys. 177, 31 - 38, (1976)

Miller, Th.B.: A dual role for insulin in the regulation of cardiac glycogensynthase. J. Biol. Chem. 253, 5389 - 5394, (1978)

Miller, Th.B., Praderio, M., Wolleben, Ch., Bullmann, J.: A hypersensitivity of glycogenphosphorylase activation in hearts of diabetic rats. J. Biol. Chem. 256, 1748 - 1753, (1981)

Mochizuki, S., Neely, J.R.: Control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cardiac muscle. J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 221 - 236, (1979)

Morgan, H.E., Randle, P.J., Regen, D.M.: Regulation of glucose uptake by muscle. 3. The effects of insulin, anoxia, salicylate and 2,4-dinitrophenol on membrane transport and intracellular phosphorylation. Biochem. J. 93, 573 - 579, (1959)

Morgan, H.E., Cadenas, E., Regen, D.M. Park, C.R.: Regulation of glucose uptake in muscle. II. Rate limiting steps and effects of insulin and anoxia in heart muscle from diabetic rats. J. Biol. Chem. 236, 262 - 272, (1961)

Morgan, H.E., Henderson, M.J., Regen, D.M.: Regulation of glucose uptake in muscle. I. Effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation. J. Biol. Chem. 236, 253 - 261, (1961)

Morgan, H.E., Regen, D.M., Henderson, M.G., Sawyer, T.K., Park, C.R.: Regulation of glucose uptake in muscle XI. J. Biol. Chem. 236, 2162 - 2168, (1961)

Morgan, H.E., Parmeggiani, A.: Regulation of glycogenolysis by muscle. III. Control of glycogenphosphorylase activity. J. Biol. Chem. 239, 2440 - 2445, (1964)

Morgan, H.E., Regen, D.M., Park, C.R.: Identification of a mobile carrier mediated transport system in muscle. J. Biol. Chem. 239, 369 - 374, (1964)

Morgan, H.E., Neely, J.R.: Insulin and membrane transport. in „Handbook of Physiology". (Hrsgb. D.F. Steiner, N. Fremkel) 323 - 331, Am. J. Physiol. Soc., Washington, (1972)

Morrison, W.R., Smith, L.M.: Preparation of fatty acid methyl-esters and diethylacetals from lipids with boronfluoride-methanol. J. Lipid Res. 5, 600 - 608, (1964)

Most, A.S., Brachfeld, N., Gorlin, R., Wahrung, J.: Free fatty acid metabolism of the human heart at rest. J. Clin. Invest. 48, 1177 - 1188, (1969)

Mowbray, J., Ottaway, J.H.: The effect of insulin and growth hormone on the flux of tracer from labelled lactate in perfused rat heart. Eur. J. Biochem. 36, 369 - 379, (1973)

Mowbray, J., Ottaway, J.H.: The flux of pyruvate in perfused rat heart. Eur. J. Biochem. 36, 362 - 368, (1973)

Müller-Ruchholtz, E.R., Lochner, W.: Utilization of glycolytic energy for external work. J. Mol. Cell. Cardiol. 13, 15 - 29, (1971)

Müller-Ruchholtz, E.R., Reinauer, H.: Regulation of pyruvate dehydrogenase in the isolated perfused heart of guinea-pigs. Biochim. Biophys. Acta 444, 33 - 42, (1976)

Murthy, V.K., Shipp, J.C.: Accumulation of myocardial triglycerides in ketotic diabetes. Diabetes 26, 222 - 229, (1977)

Neely, J.R., Bowmann, R.H., Morgan, H.E.: Effects of ventricular pressure development and palmitate on glucose transport. Am. J. Physiol. 216, 804 - 811, (1969)

Neely, J.R., Denton, R.M., England, P.J., Randle, P.J.: The effects of increased work on the tricarboxylic acid cycle and its interactions with glycolysis in the perfused rat heart. Biochem. J. 128, 147 - 159, (1972)

Neely, J.R., Morgan, H.E.: Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. Ann. Rev. Physiol. 36, 413 - 459, (1974)

Newsholme, E.A., Randle, P.J.: Regulation of glucose uptake by muscle 5. Biochem. J. 80, 662 - 665, (1961)

Newsholme, E.A., Randle, P.J., Manchester: Inhibition of the PFK reaction in perfused rat heart by fatty acids and ketone bodies. Nature 193, 270 - 271, (1962)

Newsholme, E.A., Randle, P.J.: Regulation of glucose uptake by muscle. Fructose-1,6-diphosphatase activity of rat heart and rat diaphragm. Biochem. J. 83, 387 - 392, (1962)

Newsholme, E.A., Randle, P.J.: Regulation of glucose uptake by muscle 7. Effects of fatty acids, ketone bodies, and pyruvate and of alloxan diabetes, hypophysectomy. Biochem. J. 93, 641, (1964)

Newsholme, E.A., Start, C.: Regulation des Stoffwechsels. Verlag Chemie, Weinheim, (1977)

Norum, K.R.: Palmitoyl-CoA-Carnitine-palmitoyltransferase. Biochim. Biophys. Acta 89, 95 - 108, (1964)

Nosadini, R., Ursini, F., Tessari, P., Giengo, A., Gregolin, C.: Perfused liver carnitine palmitoyltransferase activity and ketogenesis in streptozotocin treated and genetic hyperinsulinemic rats. Effect of glucagon. Horm. Metab. Res. 11, 661 - 664, (1979)

Nuttal, F.Q., Gannon, M.C., Gorbett, V.A., Wheeler, M.P.: Insulin stimulation of heart glycogensynthase-D-phosphatase. J. Biol. Chem. 251, 6724 - 6729, (1976)

Ohlen, J., Siess, E.A., Löffler, G., Wieland, O.: The effect of PDH interconversion in heart muscle of alloxan diabetic rats. Diabetologia 14, 135 - 139 (1978)

Olsen, R.E., Hoeschen, R.J.: Utilization of endogenous lipid by isolated perfused heart. Biochem. J. 103, 796 - 801, (1967)

Opie, L.H., Tansey, M.J., Kennelly, B.M.: The heart in diabetes mellitus. S. Afr. Med. J. 56, 207 - 211, (1979)

Opie, L.H., Mansford, K.R.L., Owen, P.: Effects of increased heart work on glycolysis and adeninenucleotides in the perfused heart of normal and diabetic rats. Biochem. J. 124, 475 - 490, (1971)

Opie, L.H., Bricknell, O.L.: Role of glycolytic flux in effect of glucose on decreasing fatty acid induced release of LDH from isolated coronary ligated rat heart. Cardiov. Res. 13, 693 - 702, (1979)

Oram, J.F., Bennetch, S.L., Neely, J.R.: Regulation of fatty acid utilization in isolated perfused rat hearts. J. Biol. Chem. 248, 5299 - 5309, (1973)

Ostrander, L.D., Francis, T., Hayner, N.S., Kjelsberg, M.O., Epstein, F.H.: Relationship of cardiovascular disease to hyperglycemia. Am. Intern. Med. 62, 1188 - 1198, (1965)

Owen, M.P., Carrier, G.O.: Calcium dependence of norepinephrine induced vascular contraction in experimental diabetes. J. Pharmacol. Exp. Therap. 212, 253 - 258, (1980)

Parmeggiani, A., Bowmann, R.H.: Regulation of PFK activity by citrate in normal and diabetic muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 268 - 273, (1963)

Passonneau, J.V., Lowry, O.H.: PFK and the control of citric acid cycle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 372 - 379, (1963)

Pearce, M.B., Bulloch, R.T., Kizziar, J.C.: Myocardial small vessel disease in patients with diabetes mellitus. Circulation 48, suppl., IV, 6, (1973)

Portenhauser, R., Wieland, O.: Regulation of pyruvate dehydrogenase in heart mitochondria. Z. Physiol. Chem. 358, 647 - 658, (1977)

Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.V.: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. Cancer Chemtherap. Rep. 29, 91 - 98, (1963)

Rancour, T.P., Wells, W.W.: Myo-inositol metabolism in rat testis in response to streptozotocin induced diabetes. Arch. Biochem. Biophys. 202, 150 - 159, (1980)

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A.: The glucose fatty acid cycle. Its role in insulinsensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet 13.4.1963, 785 - 789, (1963)

Randle, P.J., Newsholme, E.A., Garland, P.B.: Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan diabetes and starvation. Biochem. J. 93, 652 - 665, (1964)

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A., Denton, R.M., Pogson, C.I.: Interaction of metabolism and the physiological role of insulin. Recent Progr. Horm. Res. 22, 1 - 44, (1966)

Randle, P.J.: Apparent reversal of insulin resistance in cardiac muscle in alloxan diabetes by 2-bromostearate. Nature 221, 777 - 778, (1969)

Rasch, R.: Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. Diabetologia 16, 125 - 128, (1979)

Regan, T.J., Lyons, M.M., Ahmed, S.S., et al.: Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. J. Clin. Invest. 60, 885 - 899, (1977)

Regen, D.M., Davis, W.W., Morgan, H.E., Park, C.R.: The regulation of hexokinase and phosphofructokinase activity in heart muscle. J. Biol. Chem. 241, 632 - 649, (1964)

Reinauer, H., Grassow, G., Hollmann, S.: Aktivitätsveränderungen der Pyruvatdehydrogenase im Thiaminmangel. Z. Physiol. Chem. 349, 969 - 978, (1968)

Rerup, C.C.: Drug producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. Pharmacol. Rev. 22, 485 - 518, (1970)

Riddick, F.A., Reisler, D.M., Kipnis, D.M.: The sugar transport in striated muscle. Effect of growth hormone, hydrocortisone and alloxan diabetes. Diabetes 11, 171 - 178, (1962)

Rizza, R.A., Crass, M.F., Shipp, J.C.: Effect of insulin treatment in vivo on glycerides and glycogen of alloxan diabetic rats. Metabolism 20, 539 - 547, (1971)

Robinson, J., Newsholme, E.A.: Glycerolkinase activity in rat heart and adipose tissue. Biochem. J. 104, 2 - 4c, (1967)

Rodriguez, R.R., Krehl, V.A.: The influence of diet and insulin on the incidence of cataracts in diabetic rats. Yale J. Biol. Med. 24, 103 - 108, (1951)

Rösen, P., Schrör, K.: Increased prostacyclin release from hearts of acutely diabetic rats. Diabetologia 18, 391 - 394, (1980)

Rösen, P., Ubrig, C., Budde, T., Reinauer, H.: Regulation of lipolysis and triglyceride lipase in the diabetic heart. Adv. Physiol. Sci. (Hrsgb. A.G.B. Kovach, E. Manos, G. Rubanyi) Vol. 8, 167 - 173, Plenum Press, Budapest, (1981)

Rösen, P., Budde, T., Reinauer, H.: Triglyceride lipase activity in the diabetic heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 13, 539 - 550, (1981)

Rösen, P., Senger, W., Feuerstein, J., Grote, H., Reinauer, H., Schrör, K.: Influence of streptozotocin diabetes on myocardial lipids and prostaglandin release by the rat heart. Biochem. Med., im Druck, (1983)

Rosell-Perez, M., Villar-Pilasi, C., Larner, J.: Studies on UDPG-glycogen-transglucosylase. Biochemistry 1, 763 - 768, (1962)

Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y.Z., Kumral, T., Brauwood, A.W., Grishman, A.: A new type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. Am. J. Cardiol. 30, 595 - 602, (1972)

Rudas, B.: Streptozotocin. Arzneimittel Forsch. 23, 830 - 861, (1972)

Rynkiewicz, A., Semetkovska-Jurkiewez, E., Wyrzykowski, B.: Systolic and diastolic time invervals in young diabetics. Br. Heart J. 44, 280 - 283, (1980)

Sallmann, V.L., Grimes, P.: Eye changes in streptozotocin diabetes in rats. Am. J. Ophthalmology 71, 312 - 319, (1971)

Salomon, Y., Loudos, C., Rodbell, M.: A highly sensitice adenylcyclase assay. Anal. Biochem. 58, 541 - 548, (1974)

Sanderson, J.E., Brown, D.J., Rivellesse, A., Kohner, E.: Diabetic cardiomyopathy: An echocardiographic study of young diabetics. Br. Med. J. i, 404 - 407, (1978)

Seneviratne, B.I.B.: Diabetic cardiomyopathy: the preclinical phase. Br. Med. J. i, 1444 - 1446, (1977)

Severson, D.L.: Characterization of lipase activities in rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 11, 569 - 583, (1979)

Severson, D.L.: Regulation of lipid metabolism in adipose tissue and heart. Canad. J. Physiol. Pharmacol. 57, 923 - 937, (1979)

Shapiro, L.M., Leatherdale, B.A., Mackinnon, J., Fletcher, R.F.: Prospective study of heart disease in untreated maturity onset diabetes. Br. Heart J. 44, 342 - 348, (1980)

Shapiro, L.M., Leatherdale, B.A., Mackinnon, J., Fletcher, R.F.: Left ventricular function in diabetes mellitus. Br. Heart J. 45, 129 - 132, (1981)

Shapiro, L.M.: Specific heart disease in diabetes mellitus. Br. J. Med. 284, 140 - 141, (1982)

Shipp, J.C., Opie, L.H., Challoner, D.R.: Fatty acids and glucose metabolism in the perfused heart. Nature 189, 1018 - 1019, (1961)

Shousboe, I., Bartels, P.D., Jensen, P.K.: Triglyceride lipase activity in subcellular fractions from beef heart. Febs. Lett. 35, 279 - 283, (1973)

Shug, A.L., Lerner, E., Elson, E., Shrago, E.: An inhibition of adeninenucleotide translocase activity by oleoyl CoA and its reversal in rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 557 - 563, (1971)

Shug, A.L., Shrago, E.: A proposed mechanism for fatty acid effects on energy metabolism. J. Lab. Clin. Med. 81, 214 - 218, (1973)

Siess, E.A., Wieland, O.: Cellular distribution of PDH phosphatase. Activity in normal, hyperinsulinized and diabetic rats. Febs. Lett. 65, 163 - 168, (1976)

Skyler, J.S. The spectrum of insulin resistance. Diabetes Care 2, 319 - 322, (1979)

Schein, P.S., Bates, R.W.: Plasma glucose levels in normal and adrenalectomized mice treated with streptozotocin and nicotinamide. Diabetes 17, 760 - 765, (1968)

Schmidt, F.H., Siegel, E.G., Trapp, V.E.: Metabolic and hormonal investigations in long term streptozotocin diabetic rats on different dietary regimens. Diabetologia 18, 161 - 168, (1980)

Scholte, H.R., Meijer, E.F.H., van Wijngaardden, G.K., Leanders, K.L.: Familial carnitine deficiency. J. Neurolog. Sciences 42, 87 - 101, (1979)

Scholte, H.R., Jennekens, F.G.I., Bouvy, J.J.B.G.: Carnitine palmitoyltransferase II deficiency with normal CPT I in skeletal muscle and leucocytes. J. Neurolog. Sciences 40, 39 - 51, (1979)

Schotz, M.G., Garfinkel, A., Heubotter, R.J., Stewart, J.E.: A rapid assay for lipoproteinlipase. J. Lipid Res. 11, 68 - 69, (1970)

Stam, H., Hülsmann, W.C.: Release of lipolytic products from heart. Hormonal stimulation, intracardiac origin and pharmacological modification. Biochem. Intern. 2, 477 - 484, (1981)

Stauffacher, W., Burr, I., Gutzeit, A., Beaven, D., Veliminsky, B.J., Renold, A.E.: Streptozotocin diabetes: time course of irreversible B-cell damage: further observations and prevention by nicotinamide. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 133, 194 - 200, (1970)

Steenbergen, C.H., Deleeuw, G., Williamson, J.R.: Analysis of control of glycolysis in ischemic hearts having heterogenous zones of anoxia. J. Mol. Cell. Cardiol. 10, 617 - 639, (1978)

Steinberg, D.: Hormone sensitive triglyceride lipase from adipose tissue. Fed. Proc. 36, 1986 - 1990, (1977)

Steiner, H., Oelz, O., Zalmd, G., Froesch, E.R.: Studies on islet cell regulation and intramuscular cellular interactions in long lasting streptozotocin diabetes in rats. Diabetologia 6, 558 - 564, (1970)

Sudgen, P.H., Smith, D.M.: The effects of insulin in glucose uptake and lactate release in the perfused working heart preparation. Biochem. J. 206, 473 - 479, (1982)

Taegtmeyer, H., Hems, R., Krebs, H.H.: Utilization of energy providing substrates in the isolated working rat heart. Biochem. J. 186, 701 - 711, (1980)

Thomas, J.A., Schleuder, K.K., Larner, J.: A rapid filter paper assay for UDPG-glucose-glycogen-glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDPG-^{14}C-glucose. Anal. Biochem. 25, 486 - 499, (1968)

Thomas, J.A., Nakai, C.: Control of glycogensynthase phosphatase from rat heart. J. Biol. Chem. 248, 2208 - 2213, (1973)

Twu, J.S., Garfinkel, A.S., Schotz, M.C.: Rat heart lipoprotein-lipase. Atherosclerosis 22, 463 - 472, (1975)

Usadel, K.H., Schwedes, U., Schöffling, K.: Der experimentelle Diabetes. in „Diabetes mellitus" (Hrsgb. K. Oberdisse), Vol. A, 521 - 560, Springer, Berlin, (1975)

van Schafftingen, E., Hers, H.G.: Synthesis of a stimulator of phosphofructokinase, most likely fructose-2,6-bisphosphate from phosphoric acid and fructose-6-phosphoric acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1524 - 1531, (1980)

van der Vusse, G.H., Roemen, T.H.M., Reneman, R.S.: Assessment of fatty acids in dog left ventricular myocardium. Biochim. Biophys. Acta 617, 347 - 352, (1980)

Vereb, G., Dombradi, V., Bot, G.: Isolation of heart specific isophosphorylase by affinity chromatography on 5'-AMP-sepharose from pig heart. Int. J. Biochem. 9, 13 - 16, (1978)

Villar-Pilasi, C.: Oligo- and polysaccharide inhibition of muscle transferase-D-phosphatase. Am. N.Y. Acad. Sci. 166, 719 - 730, (1969)

Wang, T.W., Menahan, L.A., Lech, J.J.: Subcellular localization of marker enzymes, lipase and triglyceride in rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 9, 25 - 38, (1977)

Wieland, O., Syster, M.: Glycerinkinase: Isolierung und Eigenschaften des Enzyms. Biochem. Z. 329, 320 - 321, (1957)

Wieland, O., v. Jagow-Westermann, Stukowski, B.: Kinetic and regulatory properties of heart muscle PDH. Z. Physiol. Chem. 350, 329 - 334, (1969)

Wieland, O., Siess, E., Schulze-Werthmar, F.H., Funcke, H.G., Winton, B.: Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat heart and kidney: effects of diabetes, fasting and refeeding on pyruvate dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 143, 593 - 601, (1971)

Williamson, D.H., Lund, P., Krebs, H.H.: The redox state of free nicotinamide adenine dinucleotide in the cytoplasma and mitochondria of rat liver. Biochem. J. 103, 514 - 527, (1967)

Williamson, J.R.: Mitochondrial function in the heart. Ann. Rev. Physiol. 41, 485 - 506, (1979)

Williamson, J.R., Browning, E.T., Scholz, R.: Inhibition of fatty acid stimulation of gluconeogenesis by (+)-decaoylcarnitine in perfused rat heart. Diabetes 17, 184 - 208, (1968)

Wise, L.S., Jungas, R.L.: Evidence for a dual mechanism of lipolysis activation by epinephrine in rat adipose tissue. J. Biol. Chem. 253, 2624 - 2627, (1978)

Wolf, P.O., Eistetter, K., Ludwig G.: Phenylalkyloxirane carboxylic acids, a new class of hypoglycaemic substances: hypoglycaemic and hypoketonaemic effects of sodium 2-[5-(4-chlorophenyl)-pentyl] - oxirane-2-carboxylate (B 807 27) in fasted animals. Diabetologia 22, 456 - 463, (1982)

Wollenberger, A., Ristau, O., Schoffa, G.: Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. Pflügers Arch. 270, 399 - 412, (1969)

DANKSAGUNG

Frau M. Adrian und Frau J. Feuerstein haben durch ihre gewissenhafte und kooperative Arbeit wesentlich zu dieser Untersuchung beigetragen und seien hierfür herzlich bedankt.

In Teilaspekten dieser Arbeit haben Frau Dipl. Biol. C. Ubrig (TG-Lipase) und Herr Dipl. Biol. N. Berndt (Glycogenstoffwechsel) wesentliche experimentelle Beiträge geleistet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Reinauer, der durch sein Engagement und seine großzügige Förderung diese Untersuchungen ermöglicht hat.

Copy + Sofortdruck GmbH
Bilker Allee 173 4000 Düsseldorf 1 Telefon 02 11 / 31 70 20